DER EINFLUSS VON HEXOBARBITAL AUF DIE METABOLISIERUNG VON 4-ACETYLPYRIDIN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Dietrich Schuppan
aus Berlin

1970

DER EINFLUSS VON HEXOBARBITAL AUF DIE METABOLISIERUNG VON 4-ACETYLPYRIDIN

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Dietrich Schuppan

aus Berlin

1. Referent: Prof. Dr. H. COPER

2. Referent: Prof. Dr. G. SCHENCK

Tag der mündlichen Prüfung: 22.6.1970

Tag der Promotion: 13. JULI 1970

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Freien Universität Berlin

Meiner Frau gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. med. Helmut COPER im Institut für Neuropsychopharmakologie der Freien Universität Berlin angefertigt.

Herrn Professor Dr. Helmut COPER danke ich für sein großes Interesse an dieser Arbeit. Seine stete Bereitschaft zu kritischer Diskussion theoretischer und methodischer Probleme bedeuteten eine große Hilfe bei der Durchführung der Arbeit.

Herrn Professor Dr. Gerhard SCHENCK danke ich für das mir entgegengebrachte Interesse und die wohlwollende Unterstützung und Förderung meiner Arbeit.

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

Seite

I. Einleitung und Problemstellung 4

II. Methodik 8

1. Tiermaterial, Applikation der Pharmaka und Gewinnung des Untersuchungsgutes. 8

2. Dünnschichtchromatographie 10

a) präparative DC 10
Plattenherstellung
Elution
Fließmittel
DC-Reagentien

b) quantitative Auswertung der DC 19
Platten
Gerät
Methode

3. Analytik der Modellsubstanzen 22

Nomenklatur
UV-Spektren
IR-Spektren
MS-Spektren
NMR-Spektren

Seite

III. Präparativer Teil

Synthese der Modellsubstanzen 36

IV. Ergebnisse

1. Metaboliten des 4-AP 48

a) qualitativ

b) quantitativ

2. Metaboliten des 4-AP in Anwesenheit von Hexobarbital 57

a) qualitativ

b) quantitativ

3. Pharmakologischer Effekt des 4-AP allein und in Anwesenheit von Hexobarbital 58

V. Diskussion der Ergebnisse 60

1. chemisch 60
2. biologisch 63
3. allgemeine Angaben 64
4. Verzeichnis der Abkürzungen 66

VI. Zusammenfassung 67

VII. Literaturverzeichnis 69

EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Bei der Prüfung verschiedener Pharmaka auf ihre schlafverlängernde Wirkung fanden COPER et al. (10), daß 4-Acetylpyridin (4-AP) zu einer Verlängerung der Hexobarbitalnarkose führt. Dieser Effekt beruht auf einer Hemmung der Mikrosomenenzyme, die das Hexobarbital in der Leber verstoffwechseln.
Allein gegeben hat die Substanz keine narkotische Wirkung. Außer einer kurz anhaltenden Sedierung treten auch in sehr viel höherer Dosis und über 3 Wochen täglich appliziert, keine toxischen Symptome auf (5). Die LD_{50} liegt bei der Ratte über 1 g/kg. Diese geringe Toxizität könnte auf der sehr raschen Entgiftung des 4-AP in der Leber beruhen. 4 Stunden nach Gabe von 250 mg/kg 4-AP i.p. ist keine unveränderte Substanz mehr im Körper nachzuweisen.

Die Toxizität ändert sich aber, wenn gleichzeitig Hexobarbital und 4-AP verabreicht werden. Unter diesen Bedingungen sterben die Tiere schon bei einer Dosis von 200 mg/kg 4-AP in der Narkose. Dieser Effekt kann nicht durch den verhinderten Abbau des Hexobarbitals zustande kommen, denn nach Gabe anderer Mikrosomenhemmstoffe wie CFT 1201 (Phenyldiallylessigsäure-Diäthylaminoäthylester) schlafen die Tiere z.T. wesentlich länger, ohne daß sie in der Narkose zugrunde gehen (10). Daher muß in Erwägung gezogen werden, ob nicht nur 4-AP die Metabolisierung des Hexobarbitals beeinflußt, sondern auch Hexobarbital die Entgiftung des 4-AP behindert. Dabei könnte 4-AP als freie, unveränderte Base oder als unphysiologisches Pyridinnucleotid wirksam werden.

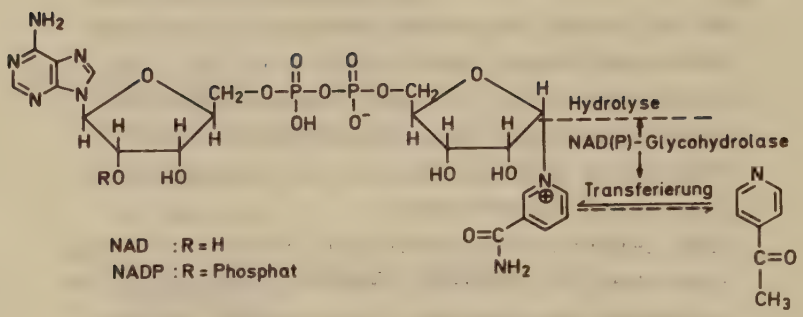
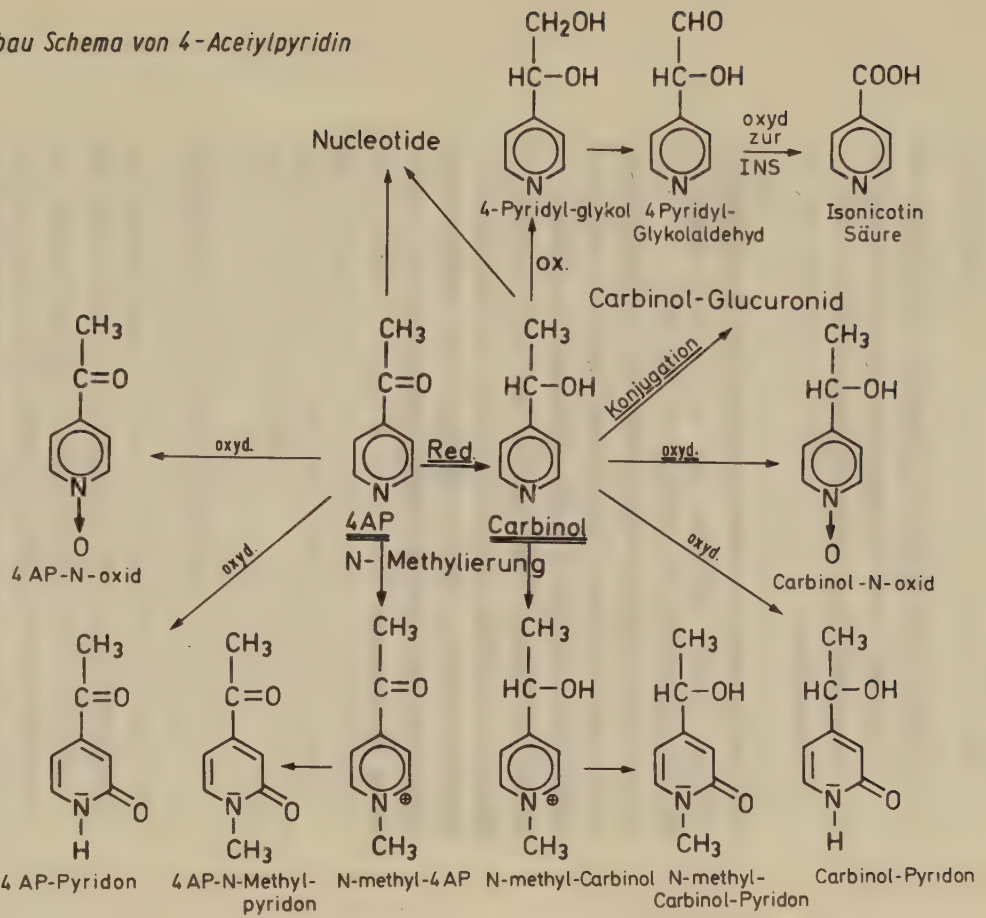


Abb. 1: 4-APAD(P); Aufbau der Pyridin-nucleotide und Angriffspunkt der NAD(P)-Glycohydrolase

Das 4-AP-Analoge des NAD(P) wird durch die geringe Spezifität der Glycohydrolasen gebildet. Der Nachweis eines 4-AP-Analogen des NAD(P) im Gehirn 4-AP-behandelter Ratten ist bisher noch nicht erbracht. Wahrscheinlich verläuft die Entgiftungsgeschwindigkeit schneller als die der Analogenbildung. Dagegen ist die in vitro-Synthese von 4-APAD(P) mit Hilfe der NAD(P)-Glycohydrolase aus Milz und Hirn gelungen (5, 6, 7).
Da die Wasserstoffanlagerung an das NAD(P)-Molekül (--- $NAD(P)H_2$) in 4-Stellung des Pyridinringes erfolgt (37), könnte durch die Bildung eines 4-APAD(P)-Analogen die Funktion des NAD(P) als Wasserstoffüberträger blockiert sein und so zum Tode der Tiere führen.

Da der Stoffwechsel des 4-AP noch nicht bekannt war, sollte in dieser Arbeit untersucht werden:

Abb. 2: *Abbau Schema von 4-Aceiylpyridin*



1. Wie verläuft die Metabolisierung von 4-AP bei alleiniger Applikation

   und

2. welche qualitativen oder quantitativen Unterschiede zeigen sich in der Zusammensetzung der 4-AP-Metaboliten bei gleichzeitiger Applikation von 4-AP und Hexobarbital.

Dabei wurde davon ausgegangen, daß der Stoffwechsel des 4-AP sich ähnlich verhält wie der von 3-AP und anderen Methyl-phenyl Ketonen. (9, 23, 44, 47) (Abb. 2)
Für die Untersuchungen standen außer der Ausgangssubstanz (4-AP) keine käuflichen 4-AP-Verbindungen zur Verfügung. Daher mußten eine Reihe Referenzsubstanzen hergestellt werden. Um Vergleiche mit den aus dem Urin gewonnenen Metaboliten anstellen zu können, wurden von ihnen die verschiedenen Molekülspektren aufgenommen (UV, MS, IR, NMR). Zur Auftrennung des Metabolitengemisches wurde die präparative DC angewandt.

METHODIK

1. Tiermaterial

Männliche Albinozuchtratten vom Stamme Wistar (Züchter Hoffmann/Berlin) im Gewicht von ca. 200 - 250 g. Standarddiät (Altromin R 10 der Firma Altrogge, Lage/Lippe) und Leitungswasser ad libitum.

Applikation von 4-Acetylpyridin

Das 4-AP wurde von der Firma Dr. F. Rasching GmbH/ Ludwigshafen am Rhein bezogen. Die Substanz wurde in Aqua dest. in einem Verhältnis gelöst, daß die Tiere immer 1,0 ml/100 g Körpergewicht erhielten. Bei der i.p. Injektion verschieden hoher Dosen 4-AP zeigte sich, daß die Tiere bis 1000 mg/kg 4-AP ohne wesentliche und äußerlich erkennbare Veränderungen oder Störungen tolerieren. Da zur qualitativen Analyse der anfallenden Metaboliten größere Substanz-Mengen notwendig sind, wurde die Dosis von 500 mg/kg 4-AP gewählt, die von den Tieren gut vertragen wird. Zur Anregung der Diurese bekamen die Tiere zusätzlich 8 ml Wasser durch eine Schlundsonde zugeführt.

Applikation von 4-AP und Hexobarbital

Wie bereits erwähnt sterben die Tiere bei einer Dosis von 200 mg/kg 4-AP, wenn gleichzeitig 100 mg/kg Hexobarbital i.p. injiziert werden. In Vorversuchen wurde festgestellt, daß bei gleichzeitiger Applikation dieser Hexobarbitalmenge die Dosis für 4-AP nicht über 150 mg/kg liegen darf. Sie erhielten daher in Kombinationsversuchen 140 mg/kg 4-AP. Für die Uringewinnung wurden 4-AP und Hexobarbital in

in Aqua dest. gelöst und die Lösungen so angesetzt, daß die Tiere insgesamt je 1,0 ml/kg Körpergewicht erhielten. Nach der i.p. Injektion von 4-AP wurden den Tieren 8 ml Wasser per os durch eine Schlundsonde und anschließend das Narkotikum i.p. gegeben.

Uringewinnung

Unmittelbar nach der Applikation wurden die Tiere in Stoffwechselkäfige gesetzt und ihr Urin, vom Kot getrennt, über 8 Stunden gesammelt (4-AP Urin). Bei gleichzeitiger Applikation von Hexobarbital wurde der Urin nur während der Schlafzeit von 4 Stunden gesammelt. Der Urin wurde in eisgekühlten Trichtern aufgefangen und alle 2 Stunden abgenommen.

Die 4-AP-behandelten Ratten schieden innerhalb von 4 Std. im Durchschnitt 11 ml Urin aus, die 4-AP- und Hexobarbital-behandelten Tiere dagegen nur 5 - 6 ml.

Urinaufarbeitung

Der angefallene Urin wird zur Abtrennung von Haaren etc. 10 Min. bei 3000 U/min zentrifugiert und die klaren Überstände lyophilisiert. Im Gegensatz zum normalen Rattenurin gelangt der 4-AP-Urin nicht ganz zur Trockne, es verbleibt eine gelbe, visköse Masse.

Da ein Teil der Referenzsubstanzen in unpolaren organischen Lösungsmitteln schlecht löslich ist, werden die getrockneten Rückstände mit 80 %igem Methanol eluiert, um alle Metaboliten zu erfassen. Mit 3 x 3 ml 80 %igem Methanol gelingt es, sie fast vollständig aus 100 ml lyophilisiertem 4-AP-Urin zu eluieren. Dabei bleibt der Hauptteil der anorgani-

schen Salze ungelöst. Die Methanolauszüge werden 10 Min. bei 3000 U/min zentrifugiert und die klaren Überstände für die chromatographische Analyse verwendet.

2. Dünnschicht-Chromatographie (DC)

a) Präparative DC

Seit STAHL (40, 41) die DC zu einem analytischen Mikroverfahren entwickelt hat, ist sie wegen der hohen Trennschärfe zur Analyse von sehr kleinen Substanzmengen oft erfolgreich benutzt worden. Nach den guten Erfahrungen im Mikrogrammbereich ist später versucht worden, auf gleichem Wege auch Milligramm- oder Gramm-Mengen zu zerlegen (16, 17).
Von unbekannten Stoffen oder Metabolitengemischen können auf diese Weise wenigstens soviel von den Hauptbestandteilen in reiner Form isoliert werden, daß eine Identifizierung mit chem.-phys. Methoden (Molekülspektren) möglich ist.
Mit Vergrößerung der Schichtdicke in der präparativen DC geht leider ein Teil der Vorteile der DC wieder verloren. Bei hoher Belastung der Platten ist die Trennschärfe z. B. wesentlich geringer. Die Urinextrakte enthalten neben den gesuchten Metaboliten reichlich physiologische Salze organischer und anorganischer Natur, wodurch die Kapazität der Platten schnell erreicht ist.

Plattenherstellung

Zur qualitativen Analyse wurden DC-Fertigplatten Kieselgel F_{254}, Schichtdicke 0, 25 mm, im Format 20 x 20 cm, Fa. Merck, verwendet. Die präparativen Platten werden

Tabelle 1

Verwendete Lösungsmittelsysteme

Bezeichnung	System	Zusammensetzung (V/V)	Laufzeit für 10 cm
F M 1	Aceton : Benzol : Aethanol : Ammoniak	40 : 40 : 10 : 5	20 Min.
F M 2	n-Butanol : Eisessig : H_2O	100 : 22 : 50	3h
F M 3	n-Butanol : Methanol : Eisessig : H_2O	90 : 35 : 15 : 60	2h 10 Min.
F M 4	Aethylacetat : n-Propanol (2) : H_2O	55 : 36 : 12	44 Min.
F M 5	Aethylacetat : Isopropanol : H_2O	45 : 45 : 10	48 Min.
F M 6	n-Propanol : Methanol : H_2O	75 : 11 : 11	1h 45 Min.
F M 7	n-Butanol : Methanol : H_2O	100 : 15 : 15	1h 45 Min.

durch Ausgießen der Kieselgelsuspension in einen 20 x 80 cm messenden, mit PVC ausgekleideten Trog hergestellt. Für zwei 20 x 40 cm-Platten werden 120 g Kieselgel PF_{254}, Merck, und 295 ml H_2O in einem 1 l-Kolben 2 Min. lang kräftig geschüttelt, die Platten ausgegossen und durch vorsichtiges Schwenken des Troges gleichmäßig verteilt. Nach zwei Tagen Lufttrocknen sind die Platten gebrauchsfertig. Für die Rechromatographie werden für 2 große Platten 120 g Kieselgel HF_{254}, Merck, und 270 ml H_2O angesetzt. Die Oberfläche der HF-Platten ist nicht so fest wie die der mit PF-Kieselgel hergestellten. Bei der Elution werden jedoch weitaus weniger Sorptions- und Bindemittel miterfaßt.
Das Auftragen erfolgt aus methanolischen Lösungen 2 cm vom unteren Rand entfernt in einer zusammenhängenden Linie.
Es wird wiederholt aufsteigend chromatographiert, d. h., nach dem Abtrocknen des Fließmittelgemisches werden die Platten noch einmal eingestellt. Je 11 Platten im Spezial-Einsatzgestell werden in der großen Desaga-Trennkammer entwickelt. Hierfür werden 1200 ml Fließmittel angesetzt und die Kammer 1 Stunde gesättigt. Die Trennstrecke beträgt 16 cm, die Umgebungstemperatur 22 - 24°C.

Elution

Nach Entwickeln der Chromatogramme werden unter einer UV-Lampe bandförmige Zonen angezeichnet und anschließend abgeschabt. Die Elution erfolgt mit 80 % Methanol. Bei der Elution von kleineren Substanzmengen aus relativ viel Kieselgel können erhebliche Schwierigkeiten auftreten, da mit dem Elutionsmittel neben der gewünschten Substanz auch unerwünschte Bestandteile des Trägermittels mit eluiert werden.

Tabelle 2

hR_F-Werte der Pyridinderivate und Metaboliten bei Verwendung verschiedener Lösungsmittelsysteme:

Modell-Substanz	Lösungsmittelsysteme						
	F M 1	F M 2	F M 3	F M 4	F M 5	F M 6	F M 7
Methyl-4-pyridyl-carbinol	50	49	58	56	53	57	64
Carbinol-N-Oxid	16	46	57	26	25	43	39
Carbinol-N-methyl-jodid	0,0	20	31	0,0	0,0	0,0	0,0
Carbinol-N-methyl-chlorid	0,0	20	31	0,0	0,0	0,0	0,0
4-Acetylpyridin	69	66	68	59	55	56	59
4-Acetylpyridin-N-Oxid	47	50	60	40	37	45	43
4-Acetyl-1-methylpyridinium Jodid	0,0	20	31	0,0	0,0	0,0	0,0

(Fortsetzung)

(Fortsetzung zu Tabelle 2)

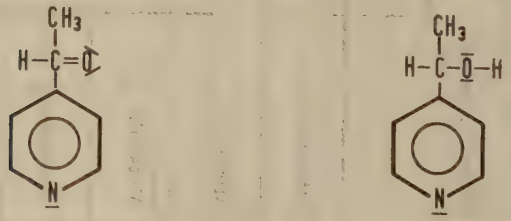
Modell-Substanz	Lösungsmittelsysteme						
	F M 1	F M 2	F M 3	F M 4	F M 5	F M 6	F M 7
Metabolit $_1$	53	48	58	54	52	57	63
Metabolit $_2$	4	30	56	25	25	49	45
Metabolit $_3$	15	46	57	50	24	42	38
Metabolit $_4$	0,0	11	32	0,0	0,0	0,0	0,0
Hexobarbital	54	81	71	75	71	62	80

Die störenden Verunreinigungen im Kieselgel und der Versuch ihrer Beseitigung durch Waschen der Platten mit polaren und unpolaren Lösungsmitteln sind von einer Reihe Autoren beschrieben worden (MILBOROW: 28; MEYER u. WHITE: 27 ; REDGEWELL u. BIELESKI: 38; MATTHEWS, PEREDA u. AQUILERA: 24; SPITZ: 39).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Platten vor Gebrauch 1mal in Methanol und 1mal in dem verwendeten Fließmittel entwickelt. Darüber hinaus wurde versucht, den Trägeranteil im Eluat durch anschließendes 30 Min. Zentrifugieren (100 000 g) der eingeengten trüben Eluate zu senken. Das Verfahren wurde mehrmals wiederholt und das letzte Eluat schließlich in einem anderen Fließmittel rechromatographiert. Die so gewonnenen Substanzen wurden anschließend zur Molekülspektroskopie verwandt.
Während die UV- und NMR-Spektren sauber waren, fanden sich im Massenspektrum und vor allem im Infrarotspektrum der isolierten Metaboliten störende Fremdstoffe.

Fließmittel

Die untersuchten Pyridinderivate besitzen in einem relativ kleinen Molekül zwei hydrophile Zentren: den heterocyclischen Stickstoff und die Keto- bzw. Hydroxylgruppe.



Die Lösungsmittelsysteme bestehen daher meist aus Alkoholen oder Ketonen und Wasser (Tab. 1). Die Chromatographie in wasserfreien Medien, bzw. bei einer nicht ausreichenden Wassermenge im Lösungsmittel, liefert langgestreckte, nicht auswertbare Streifen. Mit zunehmendem Wasserzusatz werden die Flecken jedoch scharf abgegrenzt rund, wobei eine Verschiebung zu höheren R_F-Werten eintritt und ΔR_F sich verkleinert.
7 Fließmittel wurden geprüft.
Die Ketone haben höhere R_F-Werte als die Alkohole, was bedingt ist durch die stärkere Solvatation der Hydroxylgruppe (und vermutlich auch durch die stärkere Solvatation des heterocyclischen Stickstoffs im Sinne einer stärkeren Basizität im Pyridylalkylalcohol).
Nur in den stark polaren F M 6 und 7 fällt dieser Unterschied nicht ins Gewicht, das Keton hat hier einen etwas größeren R_F-Wert (Tab. 2).

DC-Reagentien

Auf den bei 254 nm im UV-Licht durch Fluoreszenzindikator gelb-grün leuchtenden Platten waren die verwendeten Substanzen in Mengen über 1 γ erkennbar. Um die Verbindungen sichtbar zu machen, wurden folgende Reagentien benutzt:

1.) Kaliumjodplatinjodid (141)
2.) Dragendorff-Reagens (90)
3.) Koenig-Reagens (46)
4.) Naphthoresorcinol (164)

Die eingeklammerten Zahlen verweisen auf das Verzeichnis der Sprühreagentien in STAHL's Handbuch der Dünnschichtchromatographie (42).

Tabelle 3

Farbe der Substanzflecken mit verschiedenen Reagenzien auf der DC-Platte

Reagens	Modell-Substanzen						
	Methyl-4-pyridyl-carbinol	Carbinol-N-Oxid	Carbinol-N-methyl-jodid	Carbinol-N-methyl-chlorid	4-Acetylpyridin	4-Acetyl-pyridin-N-Oxid	4-Acetyl-1-methylpyridinium Jodid
1	orange/ grau-braun	s-orange/ verblassend	blau-violett/ braun	braun	gelb/braun	s-braun	violett/braun
2	rot-gelb	rot-gelb	orange	orange	orange-rot	orange-rot	orange
3	gelb-orange	negativ	negativ	negativ	rötlich-braun	negativ	negativ
4	-	-	-	-	-	-	-

(Fortsetzung)

(Fortsetzung zu Tabelle 3)

Reagens	Metabolit 1	Metabolit 2	Metabolit 3	Metabolit 4	Glucuronsäure	Hexobarbital
1	orange/ grau-braun	gelb/s-braun	negativ	grau	-	orange/braun
2	rot-gelb	violett	rot-gelb	rot-violett	-	negativ
3	gelb-orange	rot, violett	negativ	rot-violett	-	negativ
4	-	-	-	blau-violett	blau-violett	-

Während die beiden ersten genannten unspezifische Reagentien auf basischem Stickstoff darstellen, ist Koenig's-Reagens spezifisch für tertiäre Amine bzw. Pyridine mit mindestens einer unsubstituierten α-Stellung. Hiermit lassen sich gut die N-oxide und N-Methyl-derivate von den Pyridinbasen unterscheiden. Naphthoresorcinol ist ein spezifisches Zuckerreagens, hier zum Nachweis von Glucuronsäurekonjugaten (Tab. 3).

b) Quantitative Auswertung der Dünnschichtchromatogramme

Die quantitative Auswertung der Chromatogramme ist durch Remissionsmessungen auch im UV-Bereich anwendbar. Bei diesem Verfahren wird von der entwickelten DC-Platte die Remissionsänderung bei 254 nm entlang dem Querschnitt der Flecke als Funktion des Ortes mit einem angeschlossenen Schreiber aufgezeichnet. Abb. 3 zeigt das hierbei verwendete Zeiss DC-Spektralphotometer. Das Integral der Fläche unter der Kurve ist proportional zur Konzentration. Es ergeben sich annähernd Gaussche Glockenkurven.

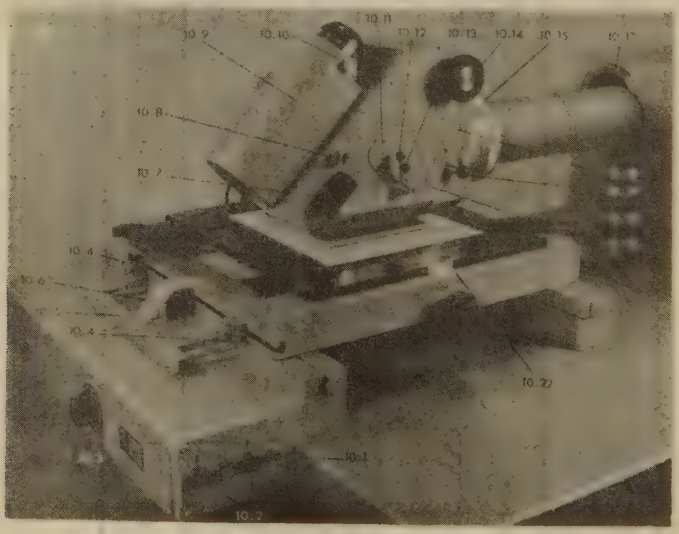


Abb. 3 Meßkopf und Kreuztisch des DC-Spektralphotometers

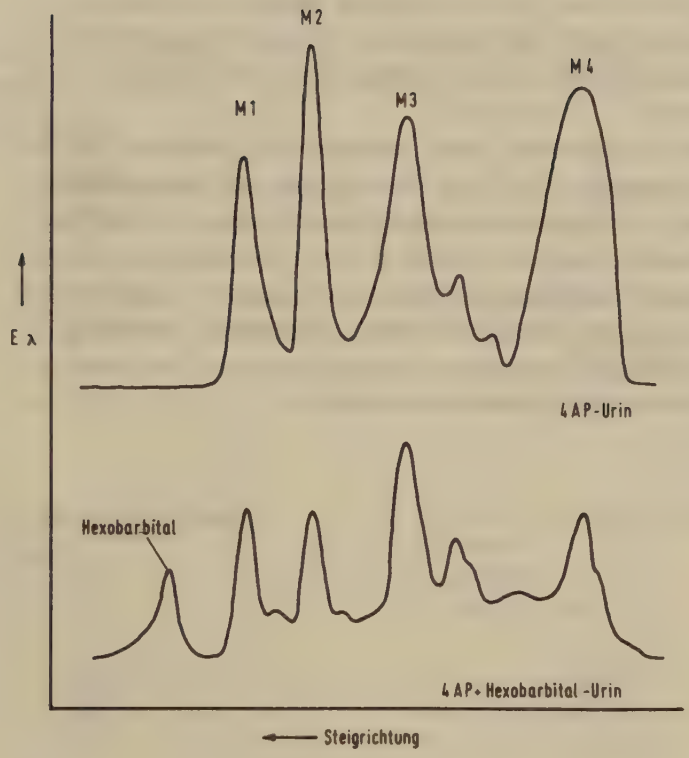


Abb. 4: Extinktionsortskurven von dünnschichtchromatographisch getrenntem Rattenurin

Zu diesen Untersuchungen wurden DC-Fertigplatten, Kieselgel F_{254}, Firma Merck, mit einer Schichtdicke von 0,25 mm verwendet. Da in den Platten beträchtliche Mengen UV-aktives Material enthalten ist, das bei der quantitativen Messung stört, werden sie reichlich mit Methanol-Uvasol Merck gewaschen. Hierzu werden je 10 Fertigplatten gebündelt aufsteigend entwickelt, wobei oben zwischen die Platten Filterpapier eingeschoben wird, das die gelbgefärbten Verunreinigungen aufnimmt.

Die Analyse erfolgt unter Anwendung von Eichkurven, die in Anlehnung an KLAUS (22) durch Zugabe der Reinsubstanzen der zu prüfenden Komponenten erstellt werden. In den vorliegenden Versuchen werden zu Teilen des Ausgangsurins definierte mg-Mengen an Reinsubstanz zugesetzt. Davon wird ein aliquoter Teil mit der Desaga Meßpipette punktförmig aufgetragen, chromatographiert und gemessen. Die Standardabweichung der Eichkurven beträgt 5 %.

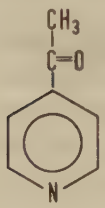
3. Analytik der Modellsubstanzen

Nomenklatur der 4-Acetylpyridin-derivate

4-AP = Acetylpyridin

C_7H_7NO

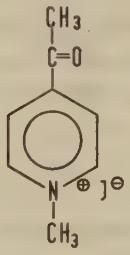
MG: 121.131



4-Acetyl-1-methyl-pyridinium Jodid

$C_8H_{10}NO\ J$

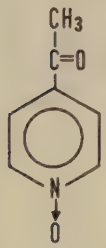
MG: 263.071



4-Acetylpyridin-N-oxid

$C_7H_7NO_2$

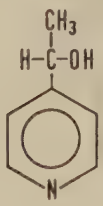
MG: 137.141



Carbinol = Methyl-4-pyridyl-carbinol

C_7H_9NO

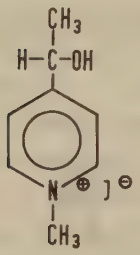
MG: 123.157



Carbinol-N-methyl-pyridinium Jodid

$C_8H_{12}NO\ J$

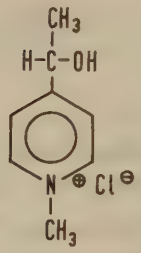
MG: 265.100



Carbinol-N-methyl-pyridinium-chlorid

$C_8H_{10}NO\ Cl$

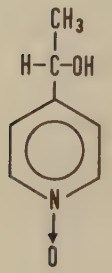
MG: 171.629



Carbinol-N-Oxid

$C_7H_9NO_2$

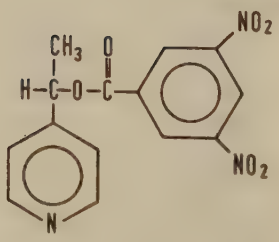
MG: 139.157



Carbinol-3.5-Dinitrobenzyl-ester

$C_{14}H_{11}N_3O_6$

MG: 318.260



UV-Spektren der Pyridin-Derivate im Bereich von 200 - 360 nm

Das Absorptionsspektrum des Pyridins besitzt 3 Absorptionsbanden bei 175, 200 und 256 nm, deren Intensität in der genannten Reihenfolge abnimmt und die den $\pi \rightarrow \pi^*$-Übergängen zugeordnet werden. Die Vibrationsstruktur der Spektren geht mit der Substition der Stammverbindung verloren und wäre auch, da im polaren Lösungsmittel Wasser gemessen wird, nicht mehr zu beobachten.

Durch Einführung auxochromer Gruppen werden die Banden bathochrom verschoben, so daß eine zweite Bande im angegebenen Bereich erscheint. Die Maxima des 4-AP liegen daher bei 275 und 219 nm (im 0,1 n HCl) (Tab. 4), die des 4-AP-N-oxids bei 288 und 220 nm.

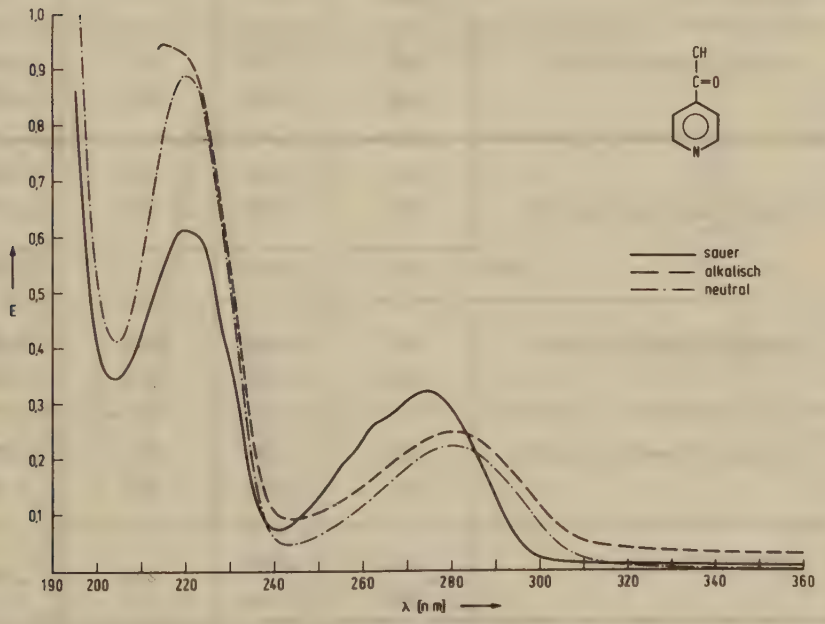


Abb. 5: UV-Spektrum von 4-Acetylpyridin

Analytik der Modellsubstanzen

1. UV-Spektren im Bereich von 200 - 360 nm

Tabelle 4

Absorptionsmaxima und -minima der Referenzsubstanzen in 0,1n HCl

Substanz	Maximum nm	ε	Minimum nm	ε
4-Acetylpyridin	275	3.200	242	0.800
	219	6.200	204	3.500
4-Acetyl-1-methylpyridi-	278	3.400	252	1.500
nium Jodid	225	22.300	208	7.900
4-Acetylpyridin-N-Oxid	288	14.500	241	0.900
	220	8.400	204	4.800
Methyl-4-pyridyl-carbinol	253	5.000	235	2.200
	219	4.500	205	3.200
pH=5,5	255	2.600	227	0.900
Carbinol-N-methyl-jodid	255	4.400	249	4.000
	225	19.600	208	7.600
Carbinol-N-methyl-chlorid	255	4.600	241	2.700
	224	7.000	205	3.500
Carbinol-N-Oxid	258	13.300	220	1.400
	206	15.600		

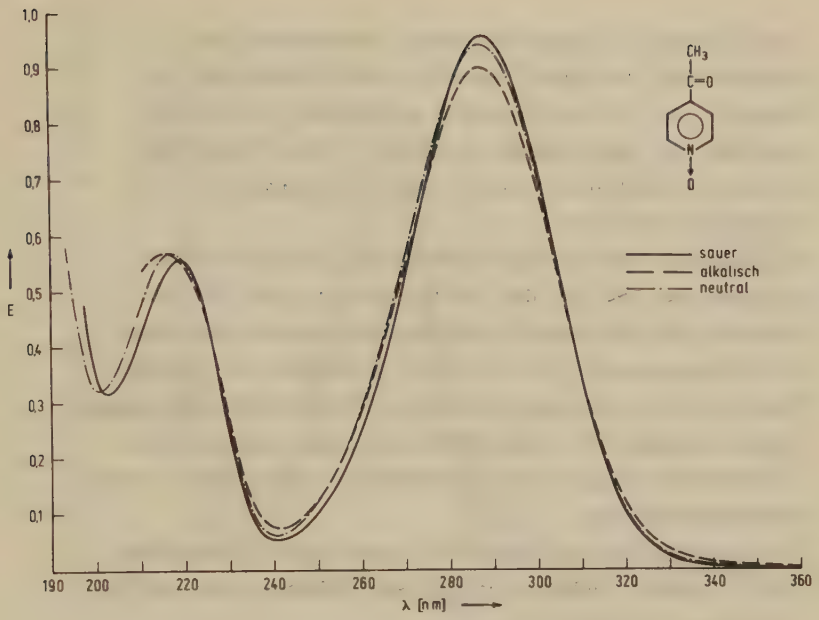


Abb. 6: UV-Spektrum von 4-Acetylpyridin-N-oxid

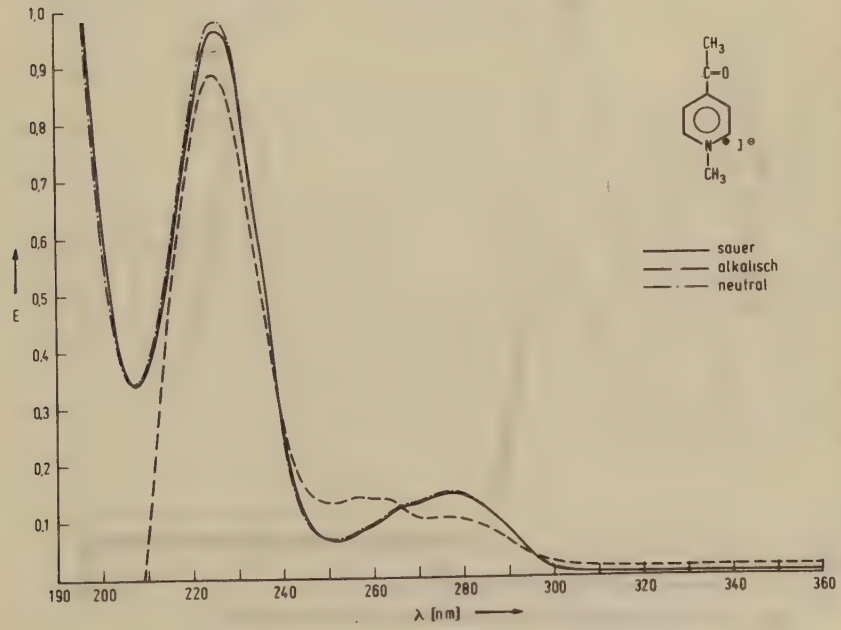


Abb. 7: UV-Spektrum von 4-Acetyl-1-methyl-pyridinium Jodid

Beim Carbinol hingegen findet keine Verschiebung der Maxima statt. Es kommt jedoch zu einer Verdopplung der Extinktion bei 254 nm im sauren pH-Bereich, gleichzeitig erscheint die zweite Bande bei 219 nm. Diese Veränderung ist bedingt durch die in saurer Lösung erfolgende Quaternierung des Stickstoffs.

In 0,1 n HCl weist das UV-Spektrum von 4-AP im rechten Maximum bei 265 nm, das des Carbinols bei 257 nm eine Schulter auf. Die N-oxide verlieren die Schultern unter starker Extinktionszunahme des rechten Maximums. Die Höhe der Extinktion beider N-oxide wird von pH-Wert-Änderungen dagegen kaum beeinflußt. Die N-Methylderivate zeigen aufgrund des quaternierten Ringstickstoffs ebenfalls im sauren Bereich keine Extinktionsänderung.

Die beschriebenen qualitativen und quantitativen Unterschiede der UV-Spektren erlauben so eine gute Differenzierung der verschiedenen Pyridinderivate.

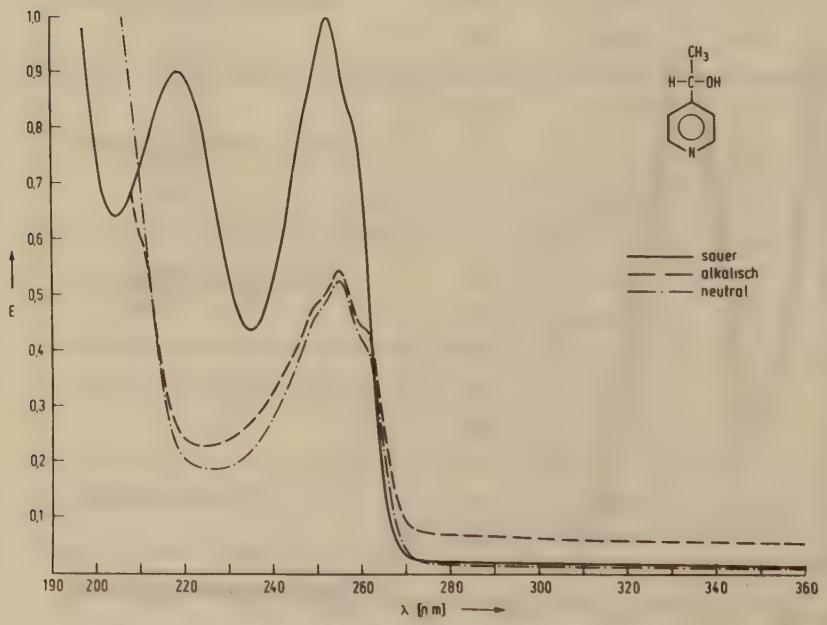


Abb. 8: UV-Spektrum von Methyl-4-pyridyl-carbinol

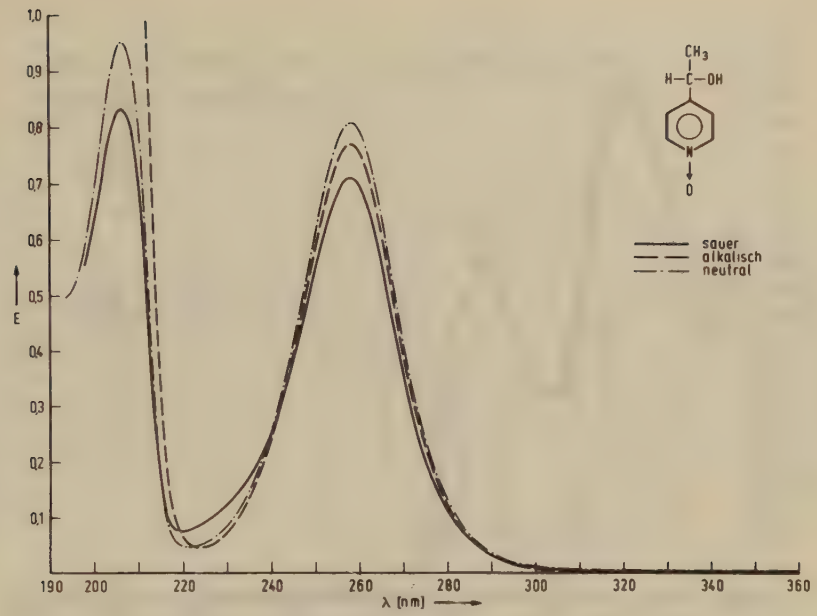


Abb. 9: UV-Spektrum von Carbinol-N-oxid

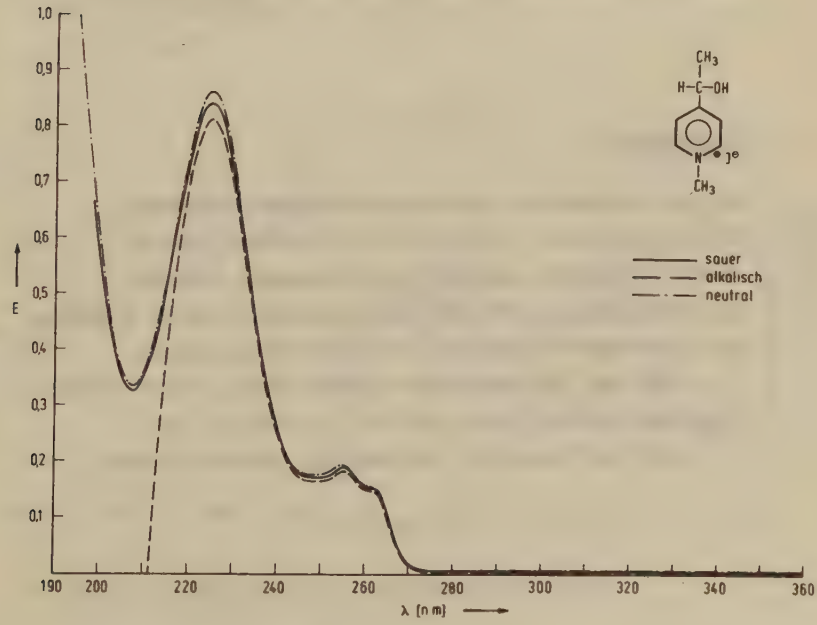


Abb. 10: UV-Spektrum von Carbinol-N-methylpyridinium Jodid

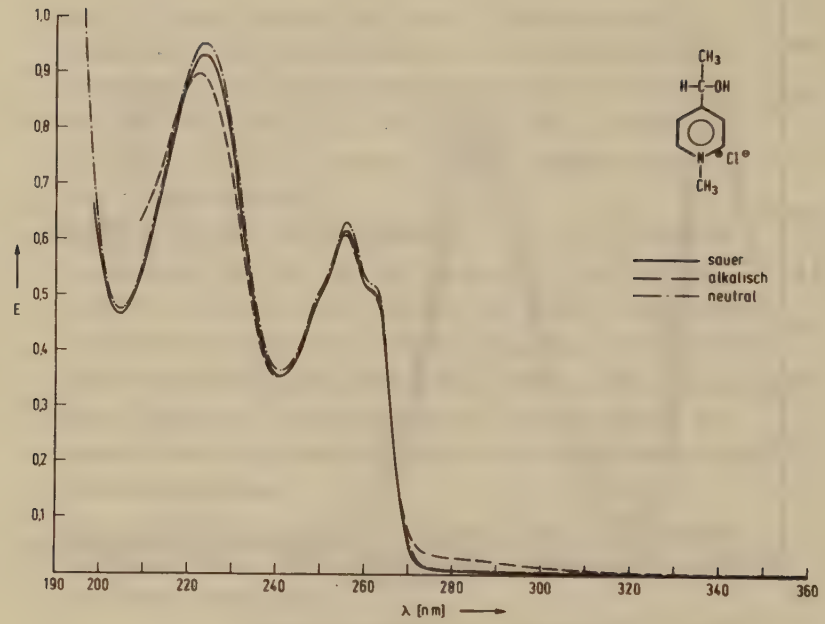


Abb. 11: UV-Spektrum von Carbinol-N-methylpyridinium Chlorid

IR-Spektren

Da die untersuchten Substanzen nur wenige funktionelle Gruppen aufweisen, sind in ihren IR-Spektren auch nur einige verwertbare spezifische Schwingungen enthalten. Die Schwingung ν 1605 cm^{-1} ist charakteristisch für 6-gliedrige aromatische Ringsysteme -C=C- (Pyridin), die bei ν 1695 cm^{-1} für aromatische Ketone (4-AP); die OH-Schwingung des Carbinols zeigt sich bei ν 1480 cm^{-1} und ν 3095 cm^{-1} weist auf $\geqslant N \rightarrow O$ hin (Carbinol-N-oxid).

Je nach Substituent sind die Hauptschwingungen etwas verschoben oder überlagert.

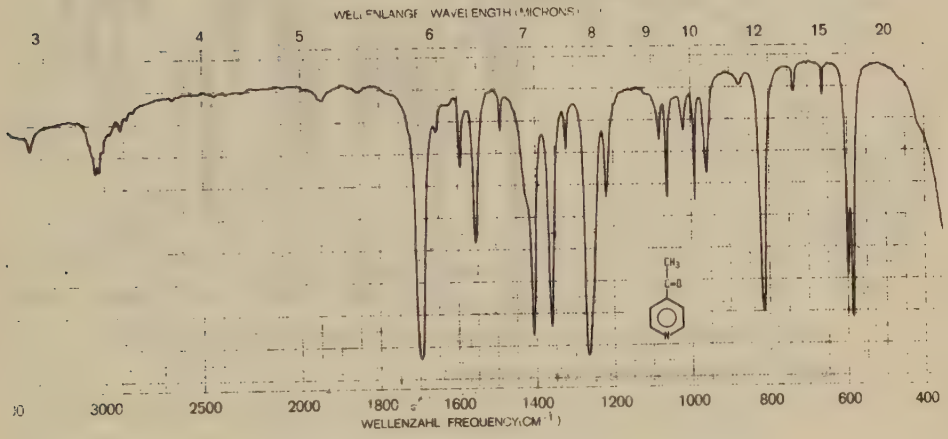


Abb. 12: IR-Spektrum von 4-Acetylpyridin

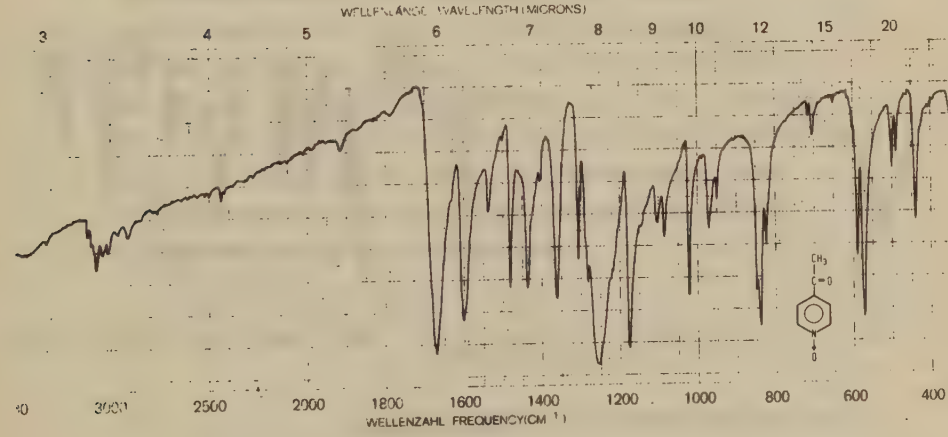


Abb. 13: IR-Spektrum von 4-Acetylpyridin-N-oxid

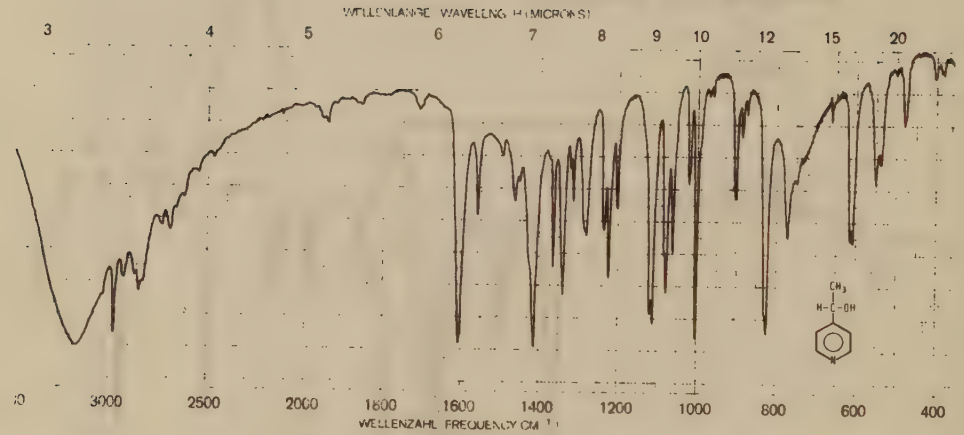


Abb. 14: IR-Spektrum von Carbinol

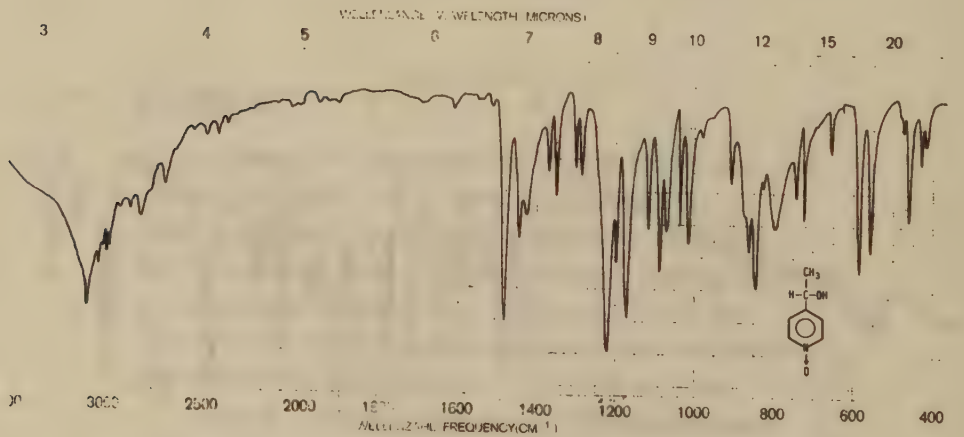


Abb. 15: IR-Spektrum von Carbinol-N-oxid

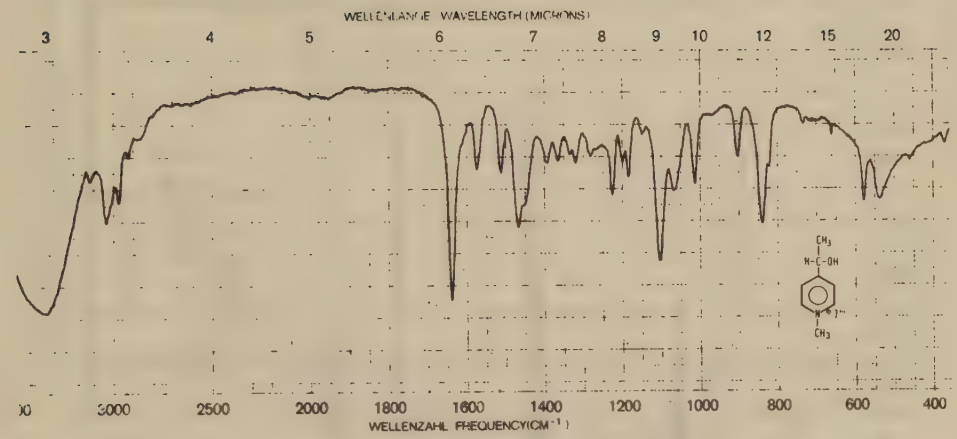


Abb. 16: IR-Spektrum von Carbinol-N-methylpyridinium Jodid

Massenspektren

Das Massenspektrum der Ausgangssubstanz zeigt als größte Masse einen Peak bei 121 (MG), das des Carbinol bei 123 (MG) m/e. Intensive Peaks finden sich weiter bei 106 (M - CH_3), 92 (Azatropylium-Ion), 78 (M - $COCH_3$), 66 (92 - H-C≡CH), 65 (92 - HCN), 52, 51 (Cyclopentadienyl-Ion = 79 - HCN), 28, 27 (HCN). Die N-oxide zeigen neben ihren Massenpeaks (137 und 139) die gleichen Bruchstücke; das gleiche gilt für die N-Methylderivate.

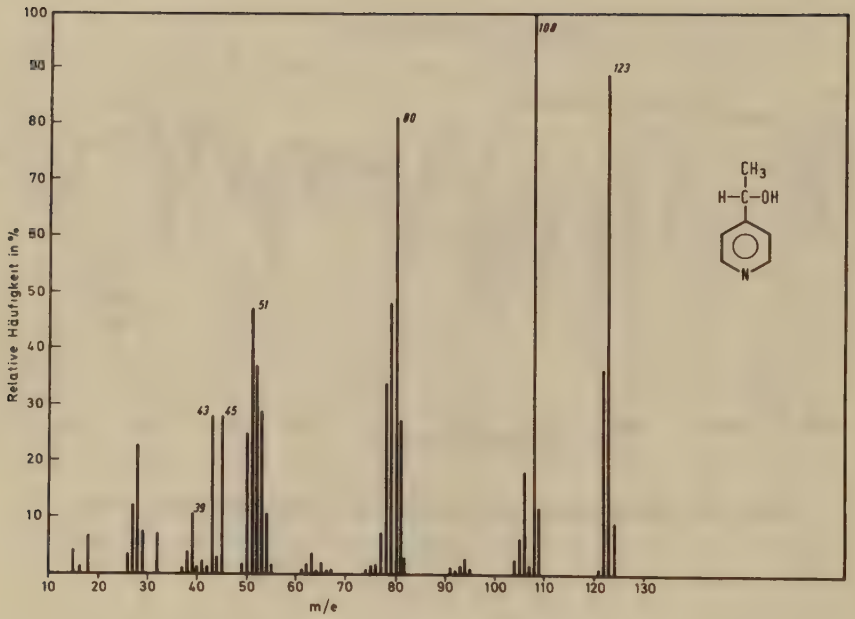


Abb. 17: Massenspektrum von Methyl-4-pyridyl-carbinol

NMR-Spektren

Die aromatischen Protonen des Pyridinringes ergeben zwei deutlich getrennte Doublets im höheren Feld (H_A, H_A', H_B, H_B'). Das Proton H_C des C_1-Atoms der Seitenkette liefert durch Austausch mit der Methylgruppe eine Quadruplett im mittleren Feld und das Doublet der endständigen Methylgruppe zeigt sich durch ein scharfes Signal im niederen Feld. Das OH-Proton des Carbinols ist durch raschen Austausch mit Wasser verschwunden, das scharfe Signal des Wassers ist im mittleren Feld zu finden.

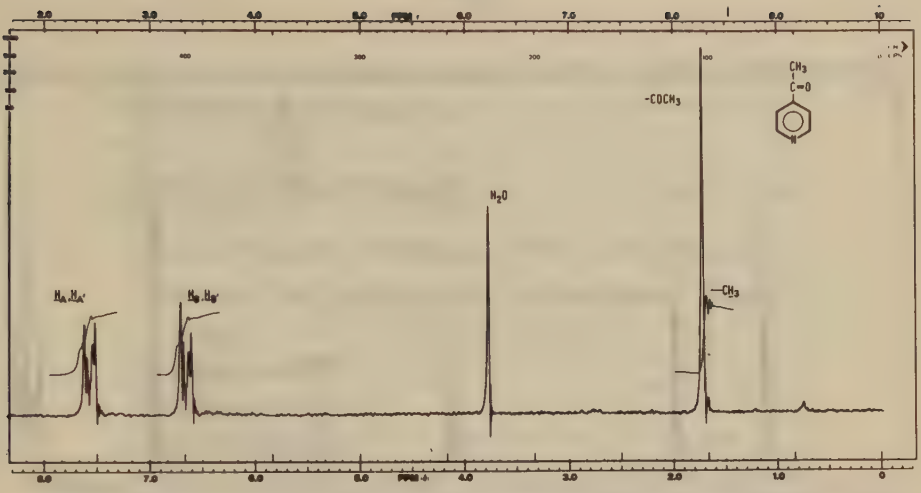


Abb. 18: 60 MHz-NMR-Spektrum von 4-AP (Sweep width 500 cps)
d 7,50 (J = 6 Hz, 2H) ($\underline{H}_A$ und $\underline{H}_A'$)
d 6,65 (J = 6 Hz, 2H) ($\underline{H}_B$ und $\underline{H}_B'$)
s 1,73 (3H) (ArCO-$\underline{CH}_3$)
Lösungsmittel s 3,78 (2$\underline{H}$) ($\underline{H}_2O$)

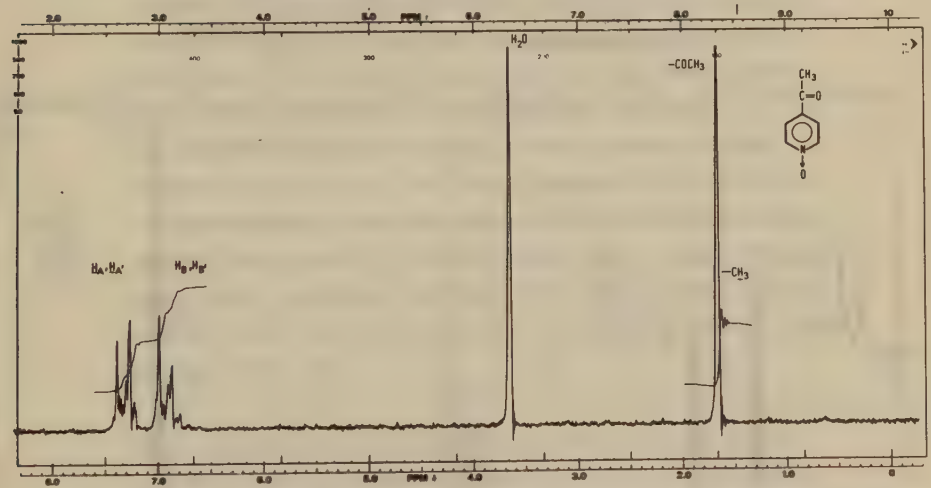


Abb. 19: 60 MHz-NMR-Spektrum von 4-AP-N-oxid (Sweep width 500 cps)
d 7,33 (J = 7 Hz, 2H) ($\underline{H}_A$ und $\underline{H}_A'$)
d 6,93 (J = 7 Hz, 2H) ($\underline{H}_B$ und $\underline{H}_B'$)
s 1,67 (3H) (ArCO-$\underline{CH}_3$)
Lösungsmittel s 3,78 (2$\underline{H}$) ($\underline{H}_2O$)

δ in ppm, s = Singulett, d = Dublett, q = Quadruplett, m = Multiplett, Reihenfolge der Angaben: Multiplizität, chem. Verschiebung δ Kopplungskonstante J, Zahl der Protonen.

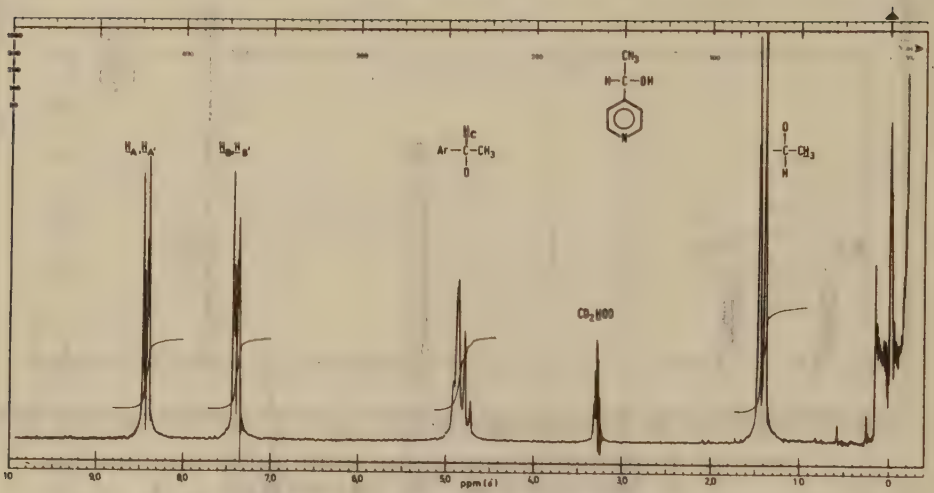


Abb. 20: 100 MHz-NMR-Spektrum von Carbinol (Sweep width 1000 cps)
d 8,43 (J = 7 Hz, 2H) ($\underline{H}_A$ und $\underline{H}_A'$)
d 7,42 (J = 7 Hz, 2H) ($\underline{H}_B$ und $\underline{H}_B'$)
q 4,82 (J = 7 Hz, 1H) ($\underline{H}_C$)
d 1,42 (J = 7 Hz, 3H) (Ar-CH(OH)-$\underline{CH}_3$)
Lösungsmittel m 3,28 (1H) ($CD_2\underline{H}OD$)

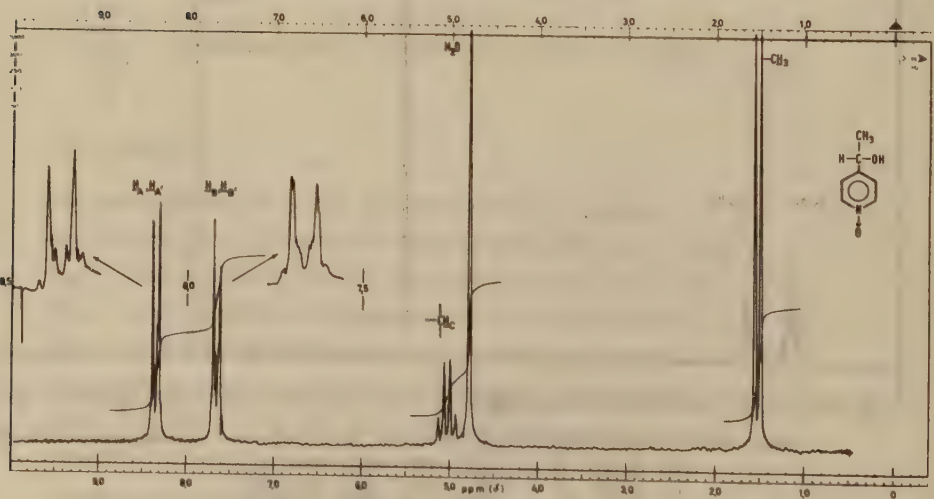


Abb. 21: 100 MHz-NMR-Spektrum von Carbinol-N-oxid (Sweep width 1000 cps)
d 8,35 (J = 7 Hz, 2H) ($\underline{H}_A$ und $\underline{H}_A'$)
d 7,66 (J = 7 Hz, 2H) ($\underline{H}_B$ und $\underline{H}_B'$)
q 5,05 (J = 7 Hz, 1H) (Ar-$\underline{CH}_C$)
d 1,53 (J = 7 Hz, 3H) (Ar-CH(OH)-$\underline{CH}_3$)
Lösungsmittel s 4,80 (2H) ($\underline{H}_2O$)

PRÄPARATIVER TEIL

Synthese der Modellsubstanzen

Folgende Molekülveränderungen wurden angenommen:

1. Reduktion der Carbonylgruppe zur sekundären Alkoholgruppe
2. N-Oxid-Bildung
3. N-Methylierung
4. Ring-Oxydierung

1. Darstellung von Methyl-4-Pyridyl-Carbinol aus 4-AP

Reduktionen mit komplexen Hydriden (34) besitzen gegenüber anderen Methoden einige wichtige Vorteile: Sie verlaufen im allgemeinen unter sehr milden Bedingungen und mit hohen Ausbeuten. Vor allem für die Umsetzung wertvoller Stoffe und kleiner Mengen sind sie hervorragend geeignet.
Da bei der Reaktion mit $LiAlH_4$ im wasserfreien Medium gearbeitet werden muß, ist dieses Reagenz für die Reduktion von Verbindungen nicht brauchbar, die in indifferenten organischen Lösungsmitteln unlöslich sind, wie z.B. Zucker und einige hier verwendete Pyridinderivate. Hier ist Natriumborhydrid wesentlich besser geeignet, da es sich in Wasser unzersetzt lösen läßt.

28,1 g (0.232 mol) 4-AP werden in 165 ml Wasser gelöst, während 40 Min. in kleinen Portionen mit 3,1 g (0.082 mol) $Na(BH_4)$ unter Rühren versetzt und die Lösung anschließend weitere 20 Min. gerührt. Danach werden 10 ml Aceton zugegeben, mit NaCl gesättigt und die Lösung zweimal mit 220 ml Chloroform ausgeschüttelt. Hierzu wird der 500 ml-Schüttel-

trichter 30 Min. in die Schüttelmaschine gehängt. Die Chloroformauszüge werden am Rotavapor eingeengt. Schließlich verbleiben 34,3 g eines klaren, schwach gelb gefärbten Rohproduktes. Eine Tüpfelprobe mit 2.4-Dinitro-phenylhydrazin zeigt eine nur minimale Gelbfärbung. Ein Dünnschichtchromatogramm ergibt, daß das eingesetzte 4-AP nahezu quantitativ zu Methyl-4-pyridyl-carbinol reduziert wurde. Das Rohprodukt wird daraufhin im Vakuum fraktioniert destilliert. Bei 90° C gehen die ersten Anteile über, der Hauptteil des Produktes destilliert bei 139 - 140° über (32 mm Hg). Das Carbinol ist bei Raumtemperatur eine farblose Flüssigkeit, die bei tieferen Temperaturen zu einer weißen, amorphen Kristallmasse erstarrt. Die Substanz ist sehr hygroskopisch und lichtempfindlich.

Das redestillierte Carbinol hatte folgende Zusammensetzung:

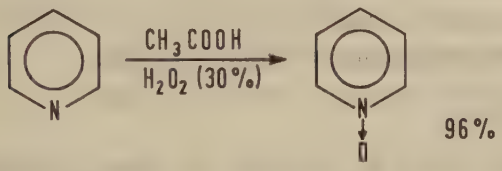
C_7H_9NO

ber.: C: 68.26, H: 7.36, N: 11.37, O: 13.00
gef.: C: 67.93, H: 7.39, N: 11,14, O: 12.94

2. Darstellung der N-Oxide

Aminoxide lassen sich aus tertiären Aminen durch Einwirkung von sauerstoffabgebenden Oxydationsmitteln gewinnen. Während bei aliphatischen Aminen die Oxydation schon unter milden Bedingungen, z.B. mit 3 % Wasserstoffperoxid, möglich ist, erfordert die Bildung von N-Oxiden der aromatisch-heterocyclischen Amine von der Art des Pyridins die Anwendung stärkerer Mittel. Die Überführung in das Aminoxid mit Hilfe von Wasserstoffperoxid gelingt bei den Pyridinen nur dann, wenn eine Carbonsäure als Lösungsmittel zugesetzt wird (45).

Die allgemeine Anwendbarkeit der Eisessig/Perhydrol-Methode zur Gewinnung von N-Oxiden der Pyridinreihe wurde von E. OCHIAI (32) erkannt.



An Stelle von Eisessig können auch andere organische Carbonsäuren verwandt werden, jedoch hat sich wasserfreie Essigsäure als günstigstes Lösungsmittel bewährt. OCHIAI empfiehlt das in Eisessig gelöste Pyridin mit einem 1.2 - 1.7fachen Überschuß (mol) an 30 % H_2O_2 zu versetzen und einige Stunden auf 70 - 80°C zu erwärmen. Aus dem eingeengten Rückstand werden sie dann umkristallisiert oder durch Destillation gereinigt.
Das 4-Methyl-pyridin-N-oxid weicht in seinem physikalischen Verhalten nach THOMAS (45) stark von den N-Oxiden des Pyridins sowie des 2- und 3-Methyl-pyridins ab (nicht hygroskopisch, höherer Fp). Die gleiche Beobachtung machte ich bei den von mir synthetisierten N-Oxiden.

Darstellung von 4-AP-N-Oxid

In Anlehnung an die Angaben von TAYLOR (43) werden 5.0 g 4-AP (0,041 mol) in 50 ml Eisessig gelöst und 8 ml 30 %iges H_2O_2 (0.078 mol) langsam zugegeben. Die Mischung wird 4 Stunden auf dem Wasserbad erwärmt. Nach dem Abkühlen wird zweimal mit 100 ml Wasser verdünnt und am Rotavapor bei 32°C eingeengt. Der gelbliche Rückstand wird in 8 ml Aether : Aethanol im Verhältnis 1 : 1 (V : V) aufgeschwemmt

und 10 Min. bei 3000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und der Rückstand noch zweimal in der gleichen Weise mit je 4 ml des Gemisches behandelt. Das weiße Produkt wird zweimal aus wenigen ml heißen Wassers umkristallisiert.
Die getrockneten weißen Kristalle, 4,3 g (86 % d. Th.), hatten einen Schmelzpunkt von 127 - 128°C.

$C_7H_7NO_2$

ber.: C: 61.31, H: 5.14, N: 10.20, O: 23.33
gef.: C: 61.84, H: 5.17, N: 9.94, O: 22.86

Carbinol-N-Oxid

Analog der 4-AP-N-Oxid-Darstellung werden 5,0 g (0.041 mol) 1-(4-Pyridyl)-aethanol in 50 ml Eisessig gelöst und mit 8 ml 30 %igem H_2O_2 langsam versetzt. Die Lösung wird während 6 Stunden unter Lichtabschluß auf 70 - 80°C erwärmt. Nach 4 Stunden werden zusätzlich 2 ml 30 %iges H_2O_2 zugegeben. Zur erkalteten Lösung werden 100 ml Wasser gegeben und im Rotavapor auf wenige ml eingeengt. Dann werden etwa 23 ml heißes Wasser sowie eine große Spatelspitze Aktivkohle hinzugefügt und das Gemisch einige Minuten auf dem Wasserbad erwärmt. Die Lösung wird durch einen harten Papierfilter (Schleicher und Schüll, Nr. 1575, 11 cm Ø) gesaugt. Das klare, schwach gelb gefärbte Filtrat gelangt am Rotavapor nicht zur Trockne. Der visköse Rückstand wird in wenigen ml heißen Wassers aufgenommen. Eine Abscheidung von Kristallen analog der 4-AP-N-Oxid-Darstellung gelang jedoch nicht, auch nicht aus anderen Lösungsmitteln. Nach mehrfachem Erwärmen und Abkühlen des eingeengten Produktes kristallisierte das Carbinol-N-Oxid nach längerer Zeit bei minus 18°C in dicken, hellgelben Kristallen aus einer braungefärbten Lösung aus.

Die Kristalle des Carbinol-N-Oxids wurden mit wenig kaltem Chloroform gewaschen und getrocknet. Die Kristalle waren nicht hygroskopisch und hatten einen Schmelzpunkt von 83 - 84°C.

$C_7H_9NO_2$

ber.: C: 60.45, H: 6.48, N: 10.00, O: 23.00
gef.: C: 60.68, H: 6.50, N: 10.00, O: 22.96

3. N-Methylierung

Darstellung von 4-Acetyl-1-methylpyridinium Jodid

24,2 g (0,2 mol) 4-AP werden in 50 ml Methanol gelöst, 42,6 g Methyljodid (0.3 mol) zugegeben und nach McKENNIS et al. (25) zur Reaktion 24 Std. ins Dunkle gestellt. Überstehendes Methanol und überschüssiges Methyljodid werden danach bei Raumtemperatur am Rotavapor abgezogen, und das Rohprodukt über Nach im Exsiccator getrocknet.
Die orangefarbenen Kristalle (48,6 g, 92,4 % d. Th.) schmelzen bei 169 - 171°C. Sie werden aus 500 ml Aceton zu Methanol (1 : 1 / V : V) zweimal umkristallisiert. Der Schmelzpunkt beträgt dann 176 - 177°C.

$C_8H_{10}NO\ J$

ber.: C: 36.53, H: 3.81, N: 5.32, O: 6.08
gef.: C: 36.70, H: 3.78, N: 5.25, O: 5.86

Carbinol-N-methyl-pyridinium Jodid

Analog der Darstellung des 4-AP-N-methyl-Jodids werden 15,5 g (0.126 mol) Carbinol in 30 ml Methanol gelöst, mit 24,7 g (0.174 mol) Methyljodid zur Reaktion über Nacht ins

Dunkle gestellt. Nach Abziehen von Methanol und überschüssigem Methyljodid am Rotavapor bildeten sich zunächst keine Kristalle aus dem gelblich, viskösen Rückstand. Erst durch vorsichtiges Lösen in n-Butan-1-ol und Reiben mit dem Glasstab gelang schließlich die Kristallisation von langen weißen Nadeln. Diese sind extrem hygroskopisch und zerfließen sofort an der Luft. Die zweimal aus n-Butan-1-ol umkristallisierten Kristalle hatten folgende Zusammensetzung:

$C_8H_{12}NO\ J$

ber.: C: 36.24, H: 4.56, N: 5.28, O: 6.03

gef.: C: 36.31, H: 4.60, N: 5.19, O: 6.58

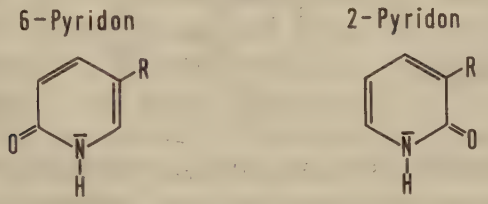
Carbinol-N-methyl-pyridinium-chlorid

Da im Urin Salze meist als Chloride vorliegen, wird das Carbinol-N-methyl-pyridinium Jodid in das entsprechende Chlorid übergeführt. Der Austausch des Anions gelingt leicht durch Ionenaustausch über eine Säule nach DECKER et al (11). Das Jodid (10 g) wird in 100 ml Wasser gelöst und die Lösung durch eine Säule von gewaschenem Dowex-2-Chlorid gegeben, die 3 cm im Durchmesser hat und 20 cm lang ist. Carbinol-N-methyl-pyridinium-chlorid erscheint im Filtrat und wird vollständig mit 250 ml Wasser eluiert wie die Bestimmung durch Messung der Lichtabsorption des Eluates bei 254 nm ergibt. Das Wasser wird im Rotavapor verdampft, und es verbleibt das reine Chlorid in einer Ausbeute von 95 %. Die Substanz ist stark hygroskopisch.

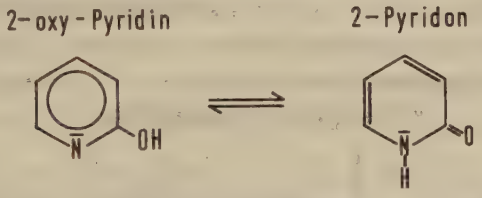
4. Ring-Oxydierung

Darstellung von 4-Acetyl-2-oxy-Pyridin

Während bei 3-substituierten Pyridinen, z.B. Nicotinamid, die Bildung von zwei verschiedenen α-hydroxy-Derivaten beobachtet wurde, erhält man bei 4-substituierten Pyridinen 2 spiegelbildisomere α-oxy-Pyridine.

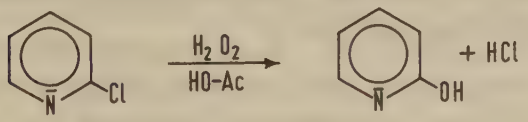


Die 2-oxy-Pyridine stehen im tautomeren Gleichgewicht mit den Pyridonen, wobei das Gleichgewicht stark nach der Seite der Pyridonform verschoben ist.

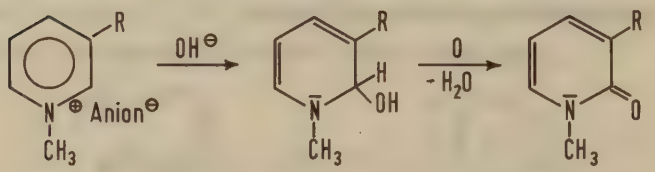


Die Darstellung der Pyridone kann auf verschiedenen Wegen erfolgen:

a) durch Verseifen des 2-Chlor-Derivates in Eisessig mit H_2O_2 in der Hitze



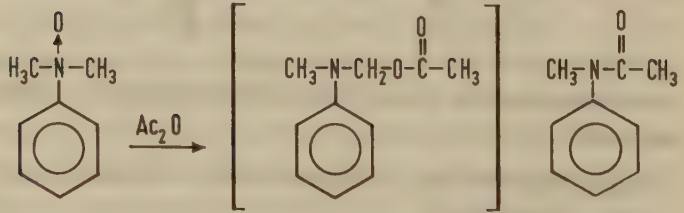
b) Die direkte Oxydation durch alkalische Ferricyamidlösung wurde für quartäre Pyridiniumsalze von PULLMAN (36) und HOLMAN (15) am Beispiel des Nicotinamids und der Nicotinsäure beschrieben. Durch die positive Aufladung des Stickstoffatoms ist die Reaktionsfähigkeit - besonders in alkalischer Lösung - viel höher.



c) schließlich durch die von KATADA (20) beschriebene Umsetzung des Pyridin-N-Oxids mit Essigsäureanhydrid in der Hitze und anschließender Hydrolyse des entstandenen 2-Acetoxy-Derivates.

Der Reaktionsmechanismus wird analog der Polonovski-Reaktion gedeutet, bei der als Zwischenprodukt ein acyliertes Carbinolamin entsteht, das dem 2-Acetoxy-Pyridin entspricht. (4, 18)

POLONOVSKI-REAKTION



Von mir wurden die beiden letztgenannten Methoden der Darstellung angewendet.

4-Acetylpyridon (2) - Darstellung mit $K_3\ [Fe(CN)_6]$

5,3 g 4-AP-N-methyljodid werden in 120 ml Wasser gelöst und 80 ml einer Lösung von 22,0 g $K_3\ [Fe(CN)_6]$ und 4,0 g NaOH unter Rühren hinzugefügt. Dieser Ansatz wird bei bei Raumtemperatur 30 Min. inkubiert. Die Mischung war schwach braun gefärbt, es war jedoch kein grünes $K_4\ [Fe(CN)_6]$ ausgefallen. Im Dünnschichtchromatogramm war neben mehreren schwachen Flecken hauptsächlich nur 4-AP-N-methyljodid zu sehen. Daraufhin wurden die Temperatur und die Inkubationszeit variiert. Nach längerer Reaktionszeit wurde mit Chloroform und Aethylacetat bei verschiedenem pH ausgeschüttelt und die getrockneten Eluate eingeengt. Es verblieb eine braune, ölige Masse.
Im Dünnschichtchromatogramm war in verschiedenen Fließmitteln jeweils eine große Zahl von Flecken zu sehen. Auf eine Aufarbeitung der zahlreichen Produkte wurde aus praktischen Gründen verzichtet.

4-Acetylpyridon (2) - Darstellung durch Umsetzen des 4-AP-N-oxids mit Essigsäureanhydrid

KATADA (20) und KLAEBE (21) erhitzten Pyridin-N-oxid mit 1,5fachem Überschuß von Essigsäureanhydrid mehrere Stunden auf 140 - 150°C. Dabei bildete sich fast quantitativ das 2(1-H)-Pyridon. Die verschiedenen Nebenprodukte wurden durch fraktionierte Destillation abgetrennt.
Analog werden 20,6 g (0.15 mol) des nach Seite 38 hergestellten 4-AP-N-oxids mit 24,0 ml Essigsäureanhydrid 8 Stunden am Rückfluß erhitzt. Die DC-Analyse der braunschwarzen Reaktionslösung ergab, daß zwar alles 4-AP-N-oxid unter Bildung einer großen Zahl neuer Produkte verbraucht war, ein Hauptprodukt sich jedoch nicht ausmachen ließ.

Reaktionsmechanismus

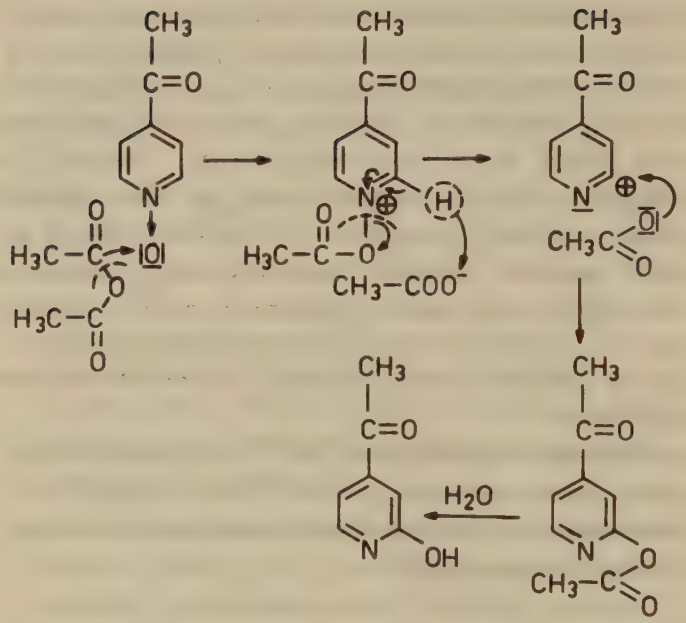


Abb. 22

Daraufhin wurde bei weiteren Ansätzen durch langsames Steigern der Temperatur geprüft, wann das 4-AP-N-Oxid zerfällt.

Bei etwa 60 - 65°C bereits färbt sich die Lösung braun, und in der DC ist neben 4-AP-N-Oxid ein großer Teil freies 4-AP nachzuweisen, ohne daß neue Flecke sichtbar sind.

Das gleiche negative Ergebnis erhält man beim Umsetzen des Carbinol-N-oxids mit Essigsäureanhydrid. Auch ein

größerer Überschuß an Anhydrid brachte keine Verbesserung des Reaktionsablaufs.

Im Gegensatz zu dem sehr hitzebeständigen Pyridin-N-oxid sind die hier verwendeten N-oxide wesentlich labiler und zerfallen schon, bevor die eigentliche Reaktionstemperatur erreicht wird.

3. 5-Dinitro-benzoylester des Carbinols

Um aus dünnschichtchromatographisch aufgetrennten Metaboliten diejenigen mit Carbinol-Struktur zu identifizieren und deren Kristallisation zu begünstigen, wurde die Bildung des Carbinol-3. 5-dinitro-benzoylesters in Betracht gezogen.

Nach der Gattermannmethode (13) zur Darstellung von Carbonsäureestern durch Alkohollyse von Säurechloriden (Einhorn-Variante) werden 1, 85 g Carbinol in Benzol gelöst, mit wasserfreiem Pyridin versetzt und langsam mit 3. 5-Dinitrobenzoylchlorid versetzt. Nach 15 Min. Erwärmen auf dem Wasserbad wird der Ansatz auf Eiswasser gegeben und angesäuert. Nach 24stündigem Stehen wird eventuell gebildete Benzoesäure mit Aether vom Überstand abgetrennt. Dann wird mit Hydrogencarbonatlösung (1 molar) gerührt und die alkalische Lösung mit Aether ausgeschüttelt. Die klaren gelben Aetherauszüge werden mit Na_2SO_4 getrocknet und eingeengt. Der Rückstand zeigt im Dünnschichtchromatogramm nur einen Koenig-positiven Fleck. Die aus Benzin umkristallisierten Kristalle (400 mg, 22 %) hatten einen Schmelzpunkt von 125°C.

$C_{14}H_{11}N_3O_6$

ber.: C: 52. 84, H: 3. 48, N: 13. 20, O: 30. 48

gef.: C: 52. 18, H: 3. 40, N: 12. 29, O: 30. 00

Die Umsetzung erfolgte zwar einheitlich, doch läßt die geringe Ausbeute es nicht günstig erscheinen, die Esterbildung zur Isolierung kleiner Mengen von Carbinol-derivaten aus DC-Trennungen anzuwenden.

ERGEBNISSE

1. Metabolismus von 4-Acetylpyridin

a) qualitativ

Isolierung von Metaboliten

Im Vergleich zum Urin unbehandelter Ratten zeigten sich nach DC-Analyse vom Harn 4-AP-behandelter Tiere in einer Reihe von Fließmitteln 4 Banden, die durch kräftige UV-Absorption bei 254 nm auffielen. Eine Bande mit jeweils kleinstem R_F-Wert war besonders intensiv.

Metabolit 1 = Carbinol

In allen Fließmitteln lief ein Metabolit (= M 1) mit jeweils größtem R_F-Wert auf gleicher Höhe wie die synthetische Referenzsubstanz Methyl-4-pyridyl-carbinol (Tab. 2). Mit den verwendeten Sprühreagentien reagierten Metabolit und Referenzsubstanz mit der gleichen Farbe (Tab. 3).

UV-Spektrum

Das UV-Spektrum des durch DC isolierten Metaboliten zeigte mit dem synthetisierten Carbinol völlige Übereinstimmung, sowohl hinsichtlich der Lage der Maxima und Minima als auch in Bezug auf die hohe Extinktionszunahme bei saurem pH-Wert.

Massenspektrum

Das MS gleicht dem des Carbinols. Peaks bei 123 (MG), 108 (123 - CH_3), 80 (108 - CO), 60, 54, 53, 52, 51, 50, 45, 44 und 43.

IR

Im IR-Spektrum ist die OH-Schwingung bei ν 3400 cm^{-1} zu sehen, ν 1605 cm^{-1} weist auf einen 6-gliedrigen Aromaten (Pyridin) und ν 1480 cm^{-1} auf -C=C- -Doppelbindungen hin.

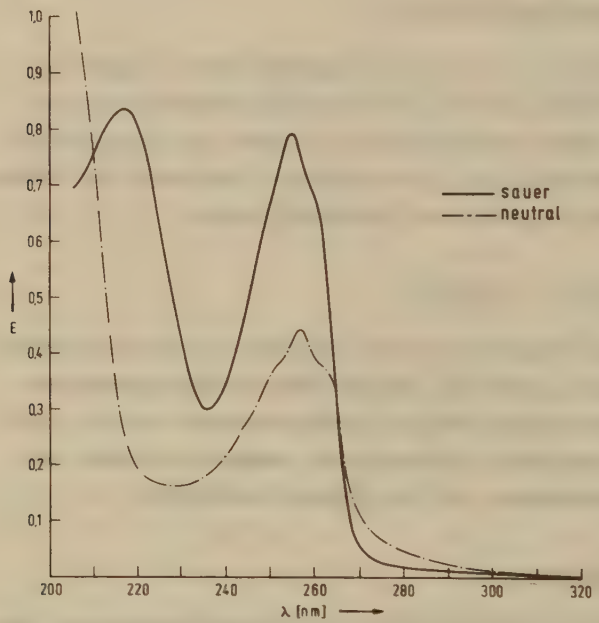


Abb. 23: UV-Spektrum von Metabolit 1

Metabolit 2

Dieser Metabolit zeigte chromatographisch ein unterschiedliches Verhalten in Bezug auf die R_F-Werte der übrigen Metaboliten. Während M_2 in den neutralen Fließmitteln den zweit-

größten R_F-Wert besaß, lief er in den übrigen FM mit einem R_F-Wert, der unter dem des Metaboliten 3 lag. Die Färbungen der DC-Flecke ähnelten z. T. denen des Metaboliten 4, z. T. denen des Carbinol.

UV-Spektrum

Das UV-Spektrum glich dem des Carbinols und zeigte die gleiche Extinktionszunahme in saurer Lösung.

IR

Im IR-Spektrum war bei ν 3450 cm^{-1} die OH-Schwingung und bei ν 1605 cm^{-1} die für arom. Ringsysteme (Pyridin) typische zu sehen.

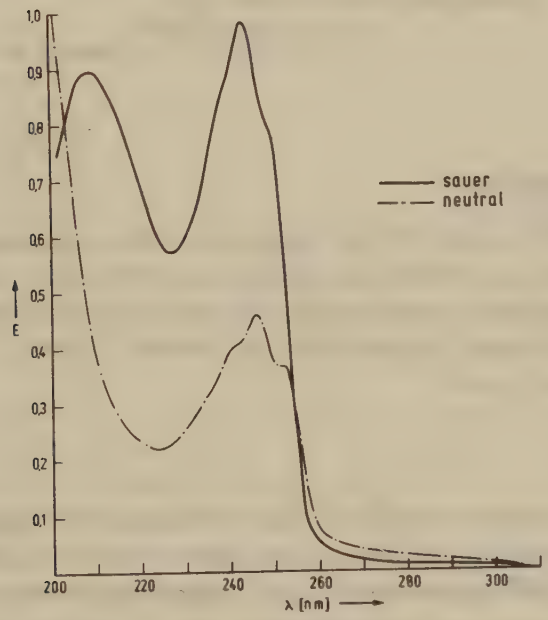


Abb. 24: UV-Spektrum von Metabolit 2

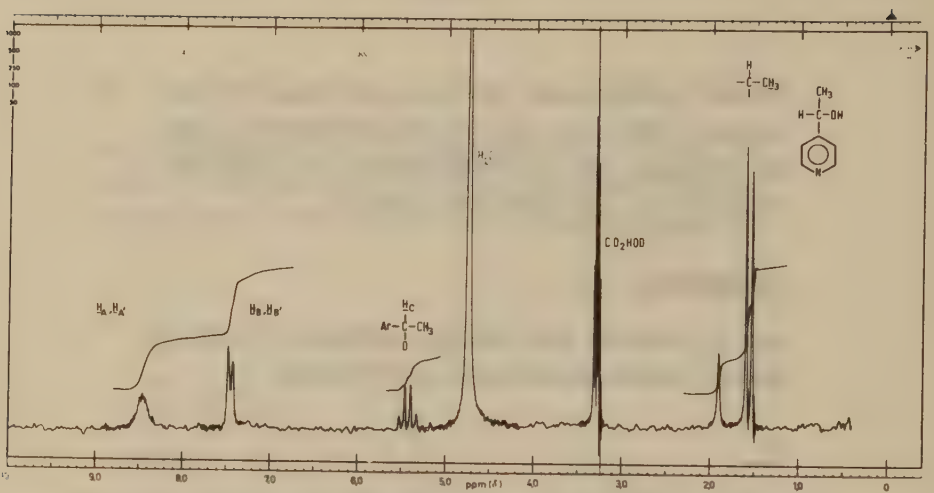


Abb. 25: 100 MHz-NMR-Spektrum von M 2 (Sweep width 1000 cps)

d (breit)	8,46	(J = 7 Hz, 2H)	($\underline{H}_A$ und $\underline{H}_{A'}$)
d	7,45	(J = 7 Hz, 2H)	($\underline{H}_B$ und $\underline{H}_{B'}$)
q	5,43	(J = 7 Hz, 1H)	($Ar-C\underline{H}_C(OH)-CH_3$)
d	1,56	(J = 7 Hz, 3H)	($Ar-CH_C(OH)-C\underline{H}_3$)
Lösungsmittel s	4,80	(2H)	(H_2O)
m	3,30	(1H)	($CD_2\underline{H}OD$)
s	1,90	(1H)	(OH), Austausch mit Wasser

Massenspektrum

Es wurden mehrere MS bei verschiedenen Heiztemperaturen aufgenommen. Neben einigen hohen Massen (212, 165), die nicht zugeordnet werden können, sind die für das Carbinol typischen Massen zu sehen: 123 (MG Carbinol), 108 (M - CH_3), 92, 80, 60, 51, 45, 43.

NMR

Im NMR-Spektrum sind durch scharfe Signale alle Protonen des Carbinols gut zu erkennen. Die große Ähnlichkeit in den Spektren mit dem Metaboliten 1 (= Carbinol) läßt vermuten, daß es sich hierbei um Carbinol handelt, daß z. B. in einer Salzform vorliegen könnte.

Metabolit 3 = Carbinol-N-oxid

Mit einem mittleren R_F-Wert in allen Fließmitteln lief Metabolit 3 nur wenig unter dem Metaboliten 2. Die negative Reaktion mit Koenig's-Reagens ließ darauf schließen, daß kein tertiärer Stickstoff vorlag. In allen verwendeten Fließmitteln lief M 3 auf gleicher Höhe wie Carbinol-N-oxid. Das UV-Spektrum war identisch mit dem der Referenzsubstanz.

IR

Das Spektrum zeigt an, daß ein Alkylpyridin vorliegt. Die Schwingungen sind nicht sehr stark ausgeprägt.

Massenspektrum

Intensive Ionen bei 139 (MG des Carbinol-N-oxids), 124 (139 - CH_3), 108 (124 - O), 96, 79, 60, 44, 43.

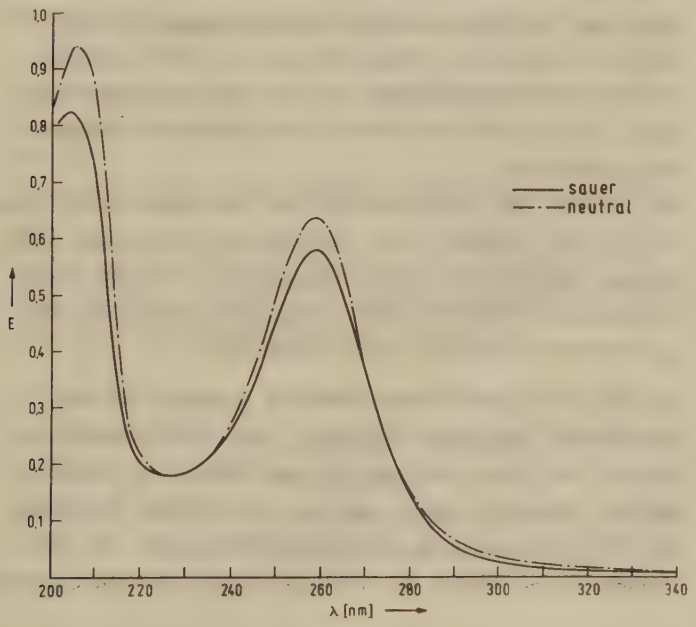


Abb. 26: UV-Spektrum von Metabolit 3

Metabolit 4 = Glucuronid des Carbinol

Die weitaus intensivste Metabolitenbande (M 4) in der DC hatte in allen Fließmitteln den kleinsten R_F-Wert. In neutralen und alkalischen FM blieb der Metabolit am Start liegen, nur in den beiden sauren Fließmitteln 2 und 3 lief M 4 mit einem hR_F-Wert von 11 bzw. 32, was auf eine saure Funktion im Molekül hindeutete. Die stark rot-violette Färbung mit Koenig's-Reagens wie auch die Extinktionszunahme im sauren Bereich ließen auf tertiären Stickstoff schließen. Durch Ansprühen der DC-Platte mit Naphthoresorcinol-Reagens und anschließendem Erhitzen der Dünnschichtplatte färbte sich der Metabolit 4 zuerst hellblau, später lila, genau wie mitaufgetragene Glucuronsäure, die jedoch einen größeren R_F-Wert hatte. Der Verdacht auf ein Glucuronid lag nahe. Zur Prüfung hierauf wurde der isolierte Metabolit mit einer von der Firma Schering freundlicherweise zur Verfügung gestellten ß-Glucuronidase 48h bei 37°C inkubiert. Das durch 1 Min. Erhitzen auf 100°C gefällte Eiweiß wurde abzentrifugiert und der klare Überstand eingeengt. Analog wurde eine Probe reinen Carbinols inkubiert und aufgearbeitet.
Abb. 27 zeigt eine Originalphotographie der entwickelten Platte, auf der zum Vergleich auch Carbinol und Glucuronsäure aufgetragen wurden. Die reine Glucuronsäure sowie die durch Hydrolyse aus dem Metaboliten freigesetzte haben denselben R_F-Wert und zeigen die gleiche Anfärbung.

Auf Höhe des synthetischen Carbinols erscheint neu das hydrolytisch freigesetzte Carbinol. Durch die 48stündige Inkubation war jedoch nur ein Teil des Metaboliten gespalten worden. Versuche zeigten, daß zur vollständigen Hydrolyse der Metabolit mehrmals inkubiert werden mußte. Die Molekülspektren bestätigten das Vorliegen eines Carbinol-Glucuronids.

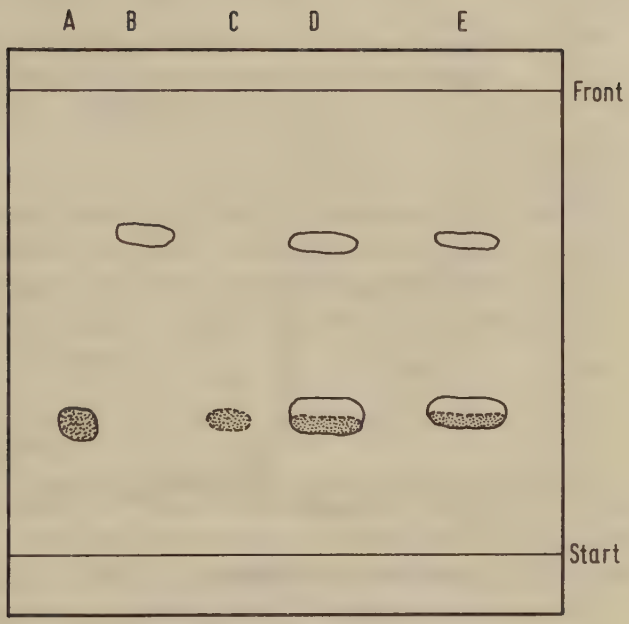


Abb. 27

Originalpause des Dünnschichtchromatogrammes von Metabolit 4.

Die umrandeten Flecken absorbieren UV-Licht der Wellenlänge 254 nm; die punktierten Flächen erscheinen violett nach Besprühen mit Naphthoresorcinol-Reagenz (46).

A	=	Metabolit 4
B	=	synthetisches Carbinol
C	=	Glucuronsäure
D u. E.	=	M 4-Ansätze, die 48 Stunden mit ß-Glucuronidase inkubiert wurden.

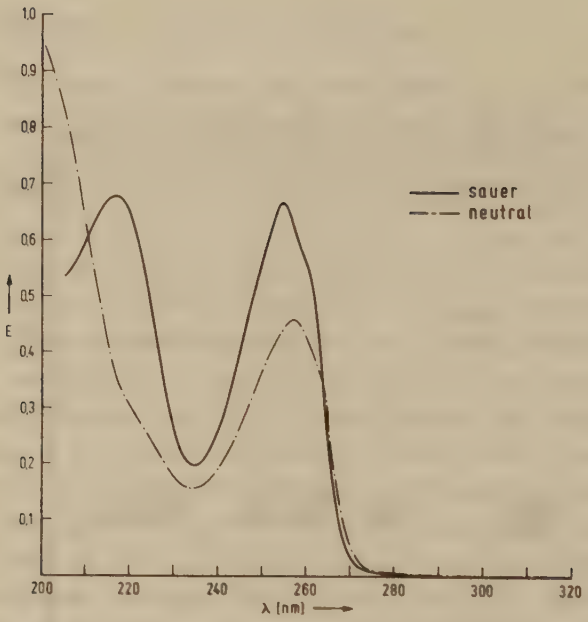


Abb. 28: UV-Spektrum von Metabolit 4

UV-Spektrum

Das Spektrum gleicht dem des Carbinols.

IR

Ein Ester oder eine Carbonsäure liegt nach dem IR-Spektrum nicht vor. Wahrscheinlich handelt es sich um das Salz einer Carbonsäure. Es besteht kein Widerspruch gegen ein Zuckerderivat. Die Banden des freien Carbinols sind gut zu sehen.

Massenspektrum

Intensive Ionen bei 123, 121, 108 (123 - CH_3), 92, 80, 79, 65, 51. Möglicherweise zersetzt sich das Glykosid bei der Verdampfung in die beiden gefundenen Komponenten.

NMR

Neben den Signalen des freien Carbinols erscheinen etwas breite Signale im unteren Feld bei 3,44, 3,60 und 4,32 ppm. Die Integrale über diesen Signalen entsprechen 5 Protonen (H_1', H_2', H_3', H_4', H_5'). In diesem Bereich findet man gewöhnlich Zucker.

b) quantitativ

Wie die qualitative Analyse des Rattenurins ergeben hatte, war in allen gefundenen Metaboliten die Carbonylgruppe zum sekundären Alcohol reduziert worden.
Die quantitative Verteilung der 4-AP-Metaboliten wurde ermittelt durch Remissionsmessungen der Flecken auf der entwickelten DC bei 254 nm, da die 4 isolierten Metaboliten bei dieser Wellenlänge ein Maximum aufweisen. Für die Metaboliten M 1, M 2 und M 4, deren UV-Spektren sich nahezu identisch verhalten, wurde zur Auswertung die Carbinol-Eichkurve benutzt. Für das N-oxid wurde eine eigene Eichkurve aufgestellt. Das Ergebnis zeigt, daß das Glucuronid der Hauptmetabolit ist. Neben 14 - 15 % freien Carbinols werden etwa 60 - 65 % an Glucuronsäure gebunden ausgeschieden. Der Anteil des Carbinol-N-oxids beträgt ca. 10 % und der des Metaboliten 2 etwa 12 %.
Absolut gesehen entsprechen die 4 Stunden nach Applikation im Urin gefundenen Mengen rund 45 % der applizierten Dosis.

2. Metaboliten des 4-AP in Anwesenheit von Hexobarbital

a) qualitativ

Der Urin von Ratten, die gleichzeitig 100 mg/kg Hexobarbital und 140 mg/kg 4-AP i.p. erhielten, wurde in gleicher Weise wie 4-AP-Harn aufgearbeitet. Es konnten die gleichen 4 Hauptmetaboliten identifiziert werden. Daneben traten keine weiteren qualitativ anderen Metaboliten des 4-AP in größerer Menge auf.

b) quantitativ

Bei der quantitativen Verteilung der 4 Metaboliten ergab sich nun ein völlig neues Bild. Die bisher stärkste Glucuronid-Bande des Carbinols war jetzt erheblich schmaler geworden und wurde von den anderen Metaboliten-Banden z.T. sogar an Intensität übertroffen.
Eine Auswertung der Chromatogramme führte zu annähernd folgender Verteilung der 4-AP-Metaboliten:

Metabolit	4-AP allein	4-AP + Hexobarbital
freies Carbinol	14 %	35 %
Metabolit 2	13 %	25 %
Carbinol-N-oxid	10 %	15 %
Carbinol-Glucuronid	63 %	18 - 22 %

Bezogen auf die applizierte Dosis 4-AP bei kombinierter Gabe mit Hexobarbital entspricht die gefundene Menge der Metaboliten etwa 25 %.

3. Pharmakologischer Effekt des 4-AP allein und in Anwesenheit von Hexobarbital

a) nach 4-AP allein

Nach einer Dosis von 500 mg/kg 4-AP i.p. kommt es bei Ratten zu einem kurz anhaltenden sedativen Effekt. Die Körpertemperatur sinkt innerhalb von 30 Minuten um 2 bis 2 1/2°C ab und steigt dann innerhalb von 5 Stunden wieder auf den Kontrollwert an (Abb. 29). Im übrigen zeigen die Tiere keine toxischen Symptome. Nach 140 mg/kg 4-AP treten keine dieser Wirkungen auf.

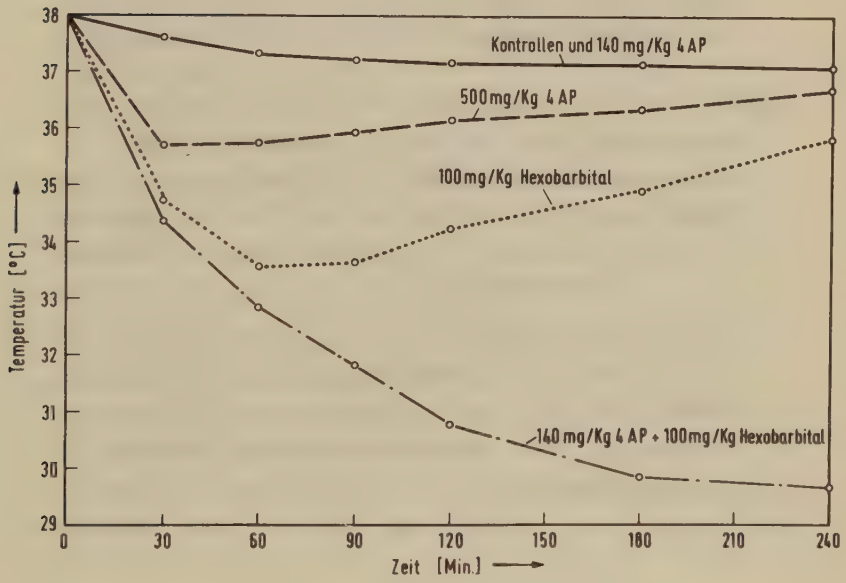


Abb. 29 Temperatur-Verlauf nach 4 AP und Hexobarbital

b) nach 4-AP und Hexobarbital

Wie oben erwähnt sterben die Tiere nach Applikation von 200 mg/kg 4-AP und 100 mg/kg Hexobarbital in der Narkose. Bei der verwendeten Hexobarbitaldosis liegt die LD_{50} für 4-AP um 155 mg/kg. Gibt man 140 mg/kg 4-AP mit 100 mg/kg des Barbiturates, schlafen Ratten bis zu 4 Stunden, Kontrolltiere dagegen nur 90 Min.. Unter der Kombinationsbehandlung sinkt die Körpertemperatur um 8°C auf 30°C ab und erreicht erst nach 16 - 18 Stunden wieder den Kontrollwert unbehandelter Tiere. Die Diurese ist während der ersten zwei Stunden nach Applikation stark gehemmt. Nach 4 Stunden scheiden die Ratten nur knapp die Hälfte des Urins aus, den die Tiere nach 4-AP-Gabe allein produzieren.

V. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

1. Chemisch

Nach den Ergebnissen muß der Abbau des 4-AP nach folgender Reaktionskette ablaufen. 4-AP wird quantitativ zum Carbinol umgewandelt. Diese Beobachtung deckt sich mit den Befunden, die NEUHOFF u. KÖHLER (30) sowie OESTERLE (33) für 3-Acetylpyridin erhoben haben. KANIG u. KORANSKY (19) fanden darüber hinaus, daß 56 % der Radioaktivität, die sie 5 Stunden nach Gabe von tritiiertem 3-AP aus dem Gehirn von Ratten isolierten, in Form des Methyl-3-pyridyl-carbinols vorlagen.

Das Carbinol wird zu einem geringen Teil direkt über die Nieren ausgeschieden. Zum größeren Teil jedoch vorher glucuronidiert, bzw. am Stickstoff oxydiert. Dieser Abbauweg unterscheidet sich deutlich von dem anderer Pyridinverbindungen (1, 2, 3, 8, 25, 26).

Nach NEUHOFF u. HARRIS (29) wird 3-AP in starkem Umfang als Pyridon und N-Methyl-pyridon (ca. 30 %) ausgeschieden. Die Pyridone und Methyl-derivate sind auch Endprodukte des Nikotinamids. Aus 4-AP wird offenbar kein Pyridon gebildet. Durch DC-Reagentien als auch im UV-Spektrum wäre ein 4-AP-Pyridon mit Sicherheit ausgemacht worden.

Ein weiterer Unterschied zum 3-AP-Stoffwechsel besteht darin, daß beim 4-AP der Carbinol-Glucuronid-Anteil mit ca. 60 % im Metabolitengemisch viel höher liegt. Auch freies Carbinol ist prozentual mehr enthalten als beim 3-AP. Der Carbinol-N-oxid-Anteil liegt mit ca. 13 - 15 % in der gleichen Größenordnung.

Ebenfalls überraschend ist das Fehlen von N-Methylderivaten des 4-AP oder Carbinols im Urin 4-AP-behandelter Tiere. GAEBLER u. BEHER (12) berichteten 1950 über einen starken Anstieg von N-Methyl-nicotinamid im Urin von Hunden nach 3-AP-Gabe. Sollten vom 4-AP N-Methyl-Metaboliten gebildet werden, dürfte ihr Anteil unter 1 % liegen.

Diese qualitativ und quantitativ verschiedene Metabolisierung von 3-AP und 4-AP ist insofern bemerkenswert, da beide Moleküle die gleiche chemische funktionelle Gruppe tragen. Sie führt zu der Erkenntnis, daß eine Substitution in 4-Stellung im Pyridinring nur bedingt Analogieschlüsse im chemischen und biologischen Verhalten im Vergleich zu 3-substituierten Pyridin-derivaten zuläßt.

Gleichzeitige Applikation von 4-AP und Hexobarbital führt zu keiner qualitativen Änderung des 4-AP-Stoffwechsels, jedoch zu einer quantitativ verschiedenen Zusammensetzung der Metaboliten.

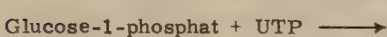
Offenbar wird unter dem Einfluß von Hexobarbital die Glucuronidierung des Carbinols gehemmt. Die Anteile an freiem Carbinol und M 2 verdoppeln sich relativ.

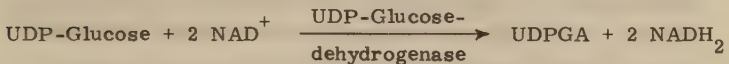
Der Befund, daß keine Metaboliten mit Acetyl-Seitenkette gefunden werden, beweist, daß die Reduktion der Carbonyl- zur Carbinol-Gruppe nicht gestört ist.

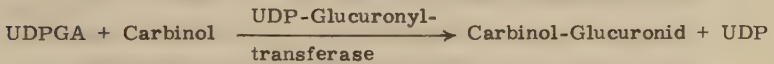
Vom Carbinol-N-oxid wird prozentual etwa die gleiche Menge gebildet, obgleich man vermuten könnte, daß hiervon mehr entstehen und ausgeschieden würde, da der Hauptelimination sweg, die Glucuronidierung, mit ca. 30 % relativ und absolut stark vermindert ist.

Die Glucuronidierung erfolgt in der Leber durch aktivierte Glucuronsäure mit Hilfe von UDP-Glucuronyltransferase.

Aktivierte Glucuronsäure (UDPGA) wird aus Glucose-1-phosphat und Uridintriphosphat (UTP) gebildet. Die Umsetzung von UDP-Glucose zu UDPGA geschieht mit Hilfe der UDP-Glucose-dehydrogenase, wobei 2 Atome Wasserstoff übertragen werden. (35)







An einem dieser Reaktionsschritte müßte der Angriffspunkt des Hexobarbitals liegen. Die Folge würde sein, daß im Tierkörper weitaus länger höhere Konzentrationen von Carbinol vorhanden sind, aus dem ein 4-AP-Carbinol-Analoges gebildet wird. Unter den oben diskutierten Umständen gewinnt die Analogenbildung als Erklärung der Toxizität an Bedeutung. Wird das normalerweise rasch metabolisierte 4-AP, wenn auch als Carbinol, im Tierkörper zurückgehalten, steht es vermehrt zum Einbau in Pyridinnukleotide zur Verfügung. Kommt es zu einer Synthese in vivo, so könnte der H_2-Transport beeinträchtigt werden.

2. Biologisch

Ein pharmakologisch auffälliger Effekt ist die durch 4-AP + Hexobarbital hervorgerufene starke Hypothermie. 4-AP allein senkt in einer Dosis von 140 mg/kg bei einer Raumtemperatur von 24°C die Körpertemperatur von Ratten nicht. In der Hexobarbitalnarkose sinkt sie um ca. 4,5°C ab. Dieser Wert ist nach 60 Min. gemessen (Abb. 29, S. 58). Bei kombinierter Gabe von 100 mg/kg Hexobarbital und 140 mg/kg 4-AP wird dieser Temperaturabfall nahezu verdoppelt, das Maximum interessanterweise aber erst nach 4 - 5 Stunden erreicht. Dieser Effekt hält viele Stunden an. Die Temperatur kehrt erst nach 16 - 18 Stunden zum Ausgangswert zurück. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, daß auch das Maximum der Analogenbildung bei 5 - 8 Stunden nach Applikation liegt und viele pharmakologische Effekte mit anderen Antimetaboliten des Nikotinamids eine Latenzzeit aufweisen. Somit treten parallel zu der erhöhten Toxizität auch andere Effekte bei der kombinierten Applikation von 4-AP und Hexobarbital verstärkt auf.

Die vorgelegten Befunde können noch nicht die Ursache für dieses Phänomen erklären, sie zeigen jedoch, wie eine allein völlig unschädliche Substanz (4-AP) in Verbindung mit einer normalen Barbituratdosis zu massiven Intoxikationen mit letalem Ausgang führen kann und wie der Stoffwechsel eines Pharmakons in Anwesenheit eines zweiten verändert werden kann.

3. Allgemeine Angaben

Lösungsmittel

Wasser: Für die spektrophotometrischen Messungen und für die DC wurde dreifach destilliertes Wasser verwendet.

Methanol, Aethanol, Propanol-(2), n-Butanol (1), Aethylacetat, Aceton, Benzol: Diese für die DC verwendeten Lösungsmittel wurden nach den im "ORGANIKUM" (34) erwähnten Laborvorschriften gereinigt und vor Gebrauch fraktioniert destilliert.

Eisessig und Ammoniak (25 %) p. A. wurden ohne Vorbehandlung verwendet.

Trocknung

Die Trocknung der Substanzen erfolgte über Blaugel bei 22 - 24°C/20 mm Hg (Wasserstrahlvakuum).

Schmelzpunkt

Die Schmelzpunkte wurden mit einem Lindströmblock bestimmt. Es handelt sich um unkorrigierte Werte.

Elementaranalysen

Die C-, H-, N- und O-Bestimmungen wurden vom Mikroanalytischen Laboratorium Dr. Franz Pascher, Bonn, Buschstr. 54, durchgeführt.

UV-Spektren

Die UV-Spektren im Bereich von 200 - 360 nm wurden von einem selbstregistrierenden Spektralphotometer DK 2 A der Firma Beckman ausgemessen.

IR-Spektren

IR-Spektren wurden mit je 1 mg Substanz in KBr in einem Perkin-Elmer Spektrophotometer Modell 237 im Bereich von 400 - 4000 cm^{-} aufgenommen.

Massenspektren

Die Massenspektren wurden mit einem Gerät der Firma Varian, Modell M 66 erhalten.

NMR-Spektren

Die Kernresonanz-Spektren wurden mit einem Varian-N.M.R.-Spektrophotometer A-60 A aufgenommen. Die Lösungsmittel werden bei den einzelnen Spektren angegeben.

Gefriertrocknung

Zur Lyophilisation wurde ein Gerät der Firma M. Christ, Osterode/Harz, benutzt. Die Urine wurden bei -30°C eingefroren und Wasser im Vakuum entzogen.

4. Verzeichnis der Abkürzungen

3-AP	-	3-Acetylpyridin
4-AP	-	4-Acetylpyridin
Carbinol	-	Methyl-4-pyridyl-carbinol
NS	-	Nicotinsäure
NA	-	Nicotinamid
NAD	-	Nicotinamidadenindinucleotid
NAD(P)	-	Nicotinamidadenindinucleotid-(phosphat)
UDP	-	Uridindiphosphat
UTP	-	Uridintriphosphat
UDPGA	-	Uridindiphosphatglucuronsäure
DC	-	Dünnschichtchromatographie
FM	-	Fließmittel
UV-Spektrum	-	Absorptionsspektrum im ultravioletten Licht (200 - 360 nm)
nm	-	nanometer
IR-Spektrum	-	Infrarotspektrum
MS	-	Massenspektrum
NMR-Spektrum	-	Kernresonanz-Spektrum

ZUSAMMENFASSUNG

Untersucht wird der Stoffwechsel des 4-Acetylpyridins allein und bei gleichzeitiger Applikation von Hexobarbital.

Es ergaben sich folgende Befunde:

1) 4-AP unterliegt einem raschen Stoffwechsel. Die Analyse des angereicherten Rattenurins ergibt, daß selbst nach hohen Dosen von 1000 mg/kg kein freies 4-AP im Urin nachgewiesen werden kann.

2) Es werden mögliche Referenzsubstanzen synthetisiert und ihre Analytik besprochen.

3) Aus lyophilisiertem Harn werden durch präparative DC vier Hauptmetaboliten des 4-AP isoliert, denen allen die Carbinolstruktur gemeinsam ist.
Neben wenig freiem Carbinol fällt der Hauptanteil auf das Carbinol-Glucuronid. Als 3. Metabolit wird das Carbinol-N-oxid identifiziert und weiterhin eine Substanz mit Carbinolstruktur, die wahrscheinlich ein nicht näher bestimmtes Salz des Carbinols ist.

4) Bei gleichzeitiger Applikation von Hexobarbital (100 mg/kg) und 4-AP (200 mg/kg) sterben die Tiere in der Narkose.

5) Nach kombinierter Gabe von 100 mg/kg Hexobarbital und 140 mg/kg 4-AP i.p. werden aus Rattenurin qualitativ die gleichen 4 Hauptmetaboliten isoliert. Quantitativ zeigt sich eine Verschiebung im Auftreten der 4 Metaboliten. Während Carbinol-N-oxid prozentual den gleichen Anteil ausmacht, ist das Carbinol-Glucuronid auf die Hälfte reduziert. Freies Carbinol und Metabolit 2 liegen in etwa der doppelten Menge vor.

6) Die Dosis von 500 mg/kg 4-AP i.v. bewirkt bei Ratten Hypothermie (2,5°C nach 30 Min.). Bei Applikation von 140 mg/kg 4-AP tritt dieser Effekt nicht auf. Eine Kombination von 140 mg/kg 4-AP und 100 mg/kg Hexobarbital führt zu einem Abfall der Körpertemperatur unter 30°C.

7) Es wird die gegenseitige Beeinflussung der Metabolismen von 4-AP und Hexobarbital diskutiert. Nach den vorliegenden Untersuchungen ist die hohe Toxizität der Kombination von 4-AP und Hexobarbital auf die Anwesenheit des freien Carbinols zurückzuführen, das möglicherweise über Bildung von Pyridinnukleotidanalogen in den Wasserstofftransport der Zelle störend eingreift.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1.) BEHER, W.T., W.L. ANTHONY: Studies of Antimetabolites. III. The Metabolism of 3-Acetylpyridine in vivo.
J. Biol. Chem. 203, (1953), 895

2.) BEHER, W.T., G.D. BAKER, M. MADOFF: Studies of Antimetabolites. V. Metabolism in vivo of 3-Acetylpyridine.
J. Biol. Chem. 234, 9, (1959), 2388

3.) BEHER, W.T., W.M. HOLLIDAY, O.H. GAEBLER: Studies of Antimetabolites. II. 3-Acetyl-pyridine.
J. Biol. Chem. 198, (1952), 576

4.) BELL, St., S.J. CHILDRESS: A Rearrangement of 5-Aryl-1.3-dihydro-2H- 1.4-benzodiazepine-2-one 4-Oxides.
J. Org. Chem. 27, (1962), 1691

5.) BRUNNEMANN, A., H. COPER: Vergleichende Untersuchungen über die Biosynthese der NAD(P)-Analogen des 3-Acetyl-pyridins, 4-Acetylpyridins und Isonicotinsäurehydrazids.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. 248, (1964), 514

6.) BRUNNEMANN, A., H. COPER, H. HERKEN: Biosynthese von 3-Acetylpyridin-adenin-dinucleotid-phosphat aus Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (NADP)
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. 245, (1963), 541

7.) BRUNNEMANN, A., H. COPER, H. HERKEN:
Isolierung von 3-Acetylpyridin-adenindinucleotid (3-APAD) aus dem Gehirn 3-Acetylpyridin-vergifteter Ratten.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. 244, (1962), 223

8.) CHAYKIN, St., M. DAGANI, L. JOHNSON, M. SAMLI:
The Fate of Nicotinamide in the Mouse - Urinary Metabolites.
J. Biol. Chem. 240, 2, (1965), 932

9.) CLARKE, E.G.: Isolation and Identification of Drugs.
The Pharmaceutical Press/London 1969, p. 149

10.) COPER, H., G. DEYHLE, D. v. HERRATH, J. VEIT:
Zum Mechanismus der schlafverlängernden Wirkung verschiedener Pharmaka.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. 260, (1968), 366

11.) DECKER, R.H., N. YESS, R.R. BROWN: Preparation of N^1-Methylnicotinamide Chloride by Dowex-2 Chloride.
Anal. Biochem. 3, (1962), 357

12.) GAEBLER, O.H., W.T. BEHER: Studies of Antimetabolites. I. Pyridin-3-Sulfonic-Acid and 3-Acetylpyridin.
J. Biol. Chem. 188, (1951), 343

13.) GATTERMANN - WIELAND: "Die Praxis des organischen Chemikers."
40. Aufl., Walter de Gruyter u. Co.
Berlin 1961

14.) GILETTE, I.R.: "Fortschritte der Arzneimittelforschung" Vol. 6, 13
Birkhäuser-Verlag
Stuttgart 1963

15.) HOLMAN, W.I.M., C. WIEGAND: The chemical Conversion of Nicotinic Acid and Nicotinamide to Derivates of N-methyl-2-pyridone by Methylation and Oxidation.
Biochem. J. 43, (1948), 423

16.) HALPAAP, H.: Präparative Dünnschichtchromatographie.
Chemie-Ing. Techn. 35, (1963), 488

17.) HALPAAP, H.: Grundzüge der präparativen Schichtchromatographie. 2. Mitteilung
Chemiker Ztg. (1965), 835

18.) HUISGEN, R., F. BAYERLEIN, W. HEYDKAMP: Die Acylierung der N.N-Dimethyl-arylaminoxyde; der Mechanismus der Polonovski-Reaktion.
Chem. Ber. 92, (1959), 3223

19.) KANIG, K., W. KORANSKY, G. MÜNCH, P.E. SCHULTE: Isolierung eines Metaboliten des 3-Acetyl-pyridin aus dem Gehirn und seine Identifizierung als Pyridin-3-Methyl-carbinol. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. 249, (1964), 43

20.) KATADA, M.: Polarisation of heterocyclic compounds. LII b. Reaction between pyridine 1-oxide and acid anhydrides. J. Pharm. Soc. Japan 67, (1947), 51 aus: Chemical Abstracts 45, (1951), IV

21.) KLAEBE, A., A. LATTES: Etude chromatographique de la réaction de l'anhydride acétique sur le N-oxyde de pyridine. J. Chromatog. 27, (1967), 502-504

22.) KLAUS, R.: Quantitative IN SITU Auswertung Bandenförmig Aufgetragener Substanzen in der Dünnschichtchromatographie. J. Chromatog. 40, (1969), 235

23.) MASRI, A.M. EL, J.N. SMITH, R.T. WILLIAMS: Studies in detoxication 73. The Metabolism of Alkylbenzenes: Phenylacetylene and phenyl-ethylene (Styrene). Biochem. J. 68, (1958), 199

24.) MATTHEWS, J.S., A.L. PEREDA, A. AQUILERA: Steroids. CCXV. The Quantitative Analysis of Steroids by Thin Layer Chromatography. J. Chromatog. 9, (1962), 331

25.) McKENNIS, H., L. B. TURNBULL, E. R. BOWMAN: Additional routes in the metabolism of 3-Acetylpyridine.
J. Biol. Chem. 239, (1964), 1215

26.) McKENNIS, H., L. B. TURNBULL, E. R. BOWMAN, C. N. LUKHARD: Urinary excretion of Conjugate Forms of 1-(3-Pyridyl)-ethanol after Administration of 3-Acetylpyridine.
J. Biol. Chem. 241, (1966), 1878

27.) MEYER, A. C., H. B. WHITE: Chromatoplate contamination removal.
J. Chromatog. 30, (1967), 228

28.) MILBOROW, B. V.: Iodine quenched fluorescence, a sensitive, non-destrucktive method for the detection of organic compounds on chromatoplates.
J. Chromatog. 19, (1965), 194

29.) NEUHOFF, V., T. HARRIS: Isolierung und Identifizierung von Metaboliten des 3-Acetylpyridin.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. 249, (1964), 11

30.) NEUHOFF, V., F. KÖHLER: Biochemische Analyse des Stoffwechsels von 3-AP.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. 254, (1966), 301

31.) NÜRNBERG, E.: Zur Dünnschichtchromatographie auf dem Vitamingebiet (II. Mitteilung)
D. Apotheker-Z. 101, 6, (1961), 142

32.) OCHIAI, E.: Recent Japanese Work on the Chemistry of Pyridine-1-oxide and related Compounds.
J. Org. Chem. 18, Part I, (1953), 534

33.) OESTERLE, W.: Über den Stoffwechsel des 3-Acetylpyridin in vitro.
Inaug.-Dissertation, 1966

34.) ORGANIKUM, 4. Aufl. (1964), 459

35.) PFEIFFER, S.: Biotransformation von Arzneimitteln.
Die Pharmazie 5, (1968), 225

36.) PULLMAN, M.E., S.P. COLOWICK: Preparation of 2- and 6-Pyridones of N-Methylnicotinamide.
J. Biol. Chem. 206, (1954), 121

37.) PULLMAN, M.E., A. SAN PIETRO, S.P. COLOWICK: On the Structure of Reduced Diphosphopyridinenucleotide.
J. Biol. Chem. 206, (1954), 129

38.) REDGEWELL, R.J., R.L. BIELESKI: Washing of adsorbents for thin layer-chromatography.
J. Chromatog. 30, (1961), 231

39.) SPITZ, H.: Impurities in Silica Gel as a critical Factor in the Quantitative Evaluation of an Organic Compound.
J. Chromatog. 42, (1969), 384

40.) STAHL, E.: Dünnschichtchromatographie (Methode, Einflußfaktoren und einige Anwendungsbeispiele).
Pharmazie 11, (1956), 633

41.) STAHL, E.: Neue Anwendungsgebiete der Dünnschichtchromatographie.
Angew. Chem. 73, (1961), 646

42.) STAHL, E.: Dünnschichtchromatographie - Ein Laboratoriumshandbuch, 2. Aufl.
Springer-Verlag Berlin - Heidelberg - New York 1967

43.) TAYLOR, E.C., A. CROVETTI: Pyridone-1-oxides. I. Synthesis of some nicotinic acid derivates.
J. Org. Chem. 19, (1954), 1633

44.) THIERFELDER, H., K. DAIBER: Zur Kenntnis des Verhaltens fettaromatischer Ketone im Tierkörper.
Hoppe-Seyler's Zschr. Phys. Chem. CXXX, (1923), 380

45.) THOMAS, K., D. JERCHEL: Neuere Methoden der präparativen organischen Chemie. II.
12. Die Einführung von Substituenten in den Pyridinring.
Angew. Chem. 70, 24, (1958), 719

46.) WAGNER, W.: Studien über die Naphthoresorcin-Reaktion von Tollens.
I. Grundsätzliches zur Ausführung und Beurteilung der Reaktion.
Anal. Chim. Acta 29, (1963), 182

47.) WILLIAMS, R. T.: Detoxication mechanisms.
John Wiley and Sons, Inc., New York 1959

LEBENSLAUF

Am 11. 8. 1940 wurde ich als Sohn des Chirurgen Dr. med. Carl Erwin Schuppan und seiner Ehefrau Charlotte, geb. Cramer, in Marienbad geboren.

Ich wohnte mit meiner Familie in Neu Fahrland bei Potsdam, wo ich ab 1946 die Schule besuchte.
Im Herbst 1947 siedelten wir nach Westberlin über. Am Goethe-Gymnasium bestand ich 1960 die Reifeprüfung und ging anschließend als Praktikant in die Borussia Apotheke in Berlin-Charlottenburg. Nach der pharmazeutischen Vorprüfung 1962 in Berlin begann ich im Sommersemester 1964 an der Technischen Universität Berlin das Pharmaziestudium, wechselte nach 2 Semestern an die Freie Universität Berlin und legte dort im Oktober 1967 die Pharmazeutische Prüfung ab.

Seit Januar 1968 arbeite ich unter Anleitung von Herrn Prof. Coper und Herrn Prof. Schenck an der vorliegenden Dissertation.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren:

Nerdel	(organische Chemie)	TU Berlin
Schenk	(anorganische Chemie)	TU Berlin
Eiden, Schenck	(Pharmazeutische Chemie)	FU Berlin
Hänsel	(Pharmakognosie)	FU Berlin
Herken, Neubert	(Pharmakologie)	FU Berlin
Reinert	(Botanik)	FU Berlin
Schmidt	(Hygiene und Mikrobiologie)	FU Berlin

L E B E N S L A U F

Am 11. 8. 1940 wurde ich als Sohn des Chirurgen Dr. med.
Carl Erwin Schuppan und seiner Gattin Charlotte, geb.
Cramer, in Mertendorf geboren.

Ich wohnte mit meiner Familie in Neu Pahnau bei Petsdam,
wo ich ab 1946 die Schule besuchte.

Im Herbst 1947 siedelten wir nach Westberlin über. Am
Goethe-Gymnasium bestand ich 1959 die Reifeprüfung und
ging anschließend als Praktikant in die Norgala Apotheke in
Berlin-Charlottenburg. Nach der pharmazeutischen Vorprüfung
1962 in Berlin begann ich im Sommersemester 1964 an der
Technischen Universität Berlin das Pharmaziestudium, wechsel-
te nach 2 Semestern an die Freie Universität Berlin und legte
dort im Oktober 1967 die Pharmazeutische Prüfung ab.

Seit Januar 1968 arbeite ich unter Anleitung von Herrn Prof.
Cooper und Herrn Prof. Schmook an der vorliegenden Dissertation.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren:

Bertel	(organische Chemie)	TU Berlin
Schenk	(anorganische Chemie)	TU Berlin
Zeiler, Schmook	(Pharmazeutische Chemie)	TU Berlin
Hänsel	(Pharmakognosie)	FU Berlin
Herken, Neubert	(Pharmakologie)	FU Berlin
Reisert	(Botanik)	TU Berlin
Schmidt	(Hygiene und Mikrobiologie)	FU Berlin